

**T.C.**  
**ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BRONKOALVEOLAR LAVAJ SIVISINDA HÜCRE SAYIMININ**  
**FARKLI METOTLAR ARASINDA KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. Oytun AYDOĞAN**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. Bülent ALTINSOY**

**ZONGULDAK**  
**2018**

**T.C.**  
**ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BRONKOALVEOLAR LAVAJ SIVISINDA HÜCRE SAYIMININ**  
**FARKLI METOTLAR ARASINDA KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. Oytun AYDOĞAN**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. Bülent ALTINSOY**

**ZONGULDAK**  
**2018**

## TEZ ONAY TUTANAĞI

Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte: Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi

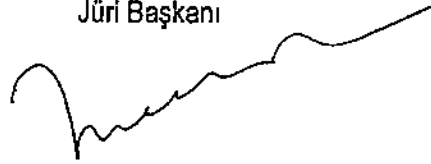
Tez Başlığı : Bronkoalveolar Lavaj Sıvısında Hücre Sayımının Farklı Metodlar Arasında Karşılaştırılması

Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Oytun AYDOĞAN

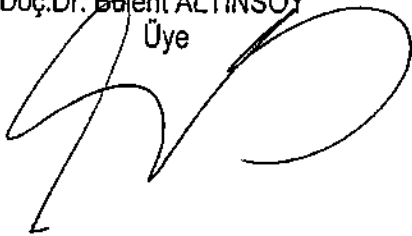
Tez Savunma Tarihi : 18/04/2018

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Bülent ALTINSOY

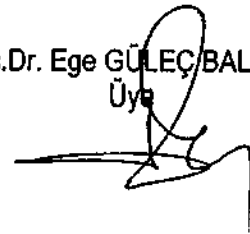
Prof.Dr. M. Meltem TOR  
Jüri Başkanı



Doç.Dr. Bülent ALTINSOY  
Üye



Doç.Dr. Ege GÜLEÇ/BALBAY  
Üye



Prof. Dr. Ali BÖRAZAN  
Dekan

## TEŞEKKÜR

Hem uzun ve zorlu uzmanlık eğitimim süresince klinik, akademik ve hayata dair bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve her daim yanımda olan hem de tez hazırlama sürecinde bana verdiği destek, yönlendirme ve yardımlarından dolayı tez danışmanım sayın hocam Doç. Dr. Bülent ALTINSOY'a

Uzmanlık eğitim sürecimi en verimli şekilde gerçimemi sağlayan üzerimde büyük emekleri olan saygıdeğer hocalarım sayın Prof. Dr. Meltem TOR ve Dr. Fatma ERBOY'a,

Çalışma fırsatı bulduğum ve üzerimde büyük emeği olan Prof. Dr. Figen ATALAY'a,

Tezimin hazırlanması ve yazım aşamasındaki destekleri için İmmünoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Mehmet ARASLI'ya, Patoloji Anabilim Dalından Doç. Dr. Burak BAHADIR'a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Füsun CÖMERT'e,

Eğitimim sürecinde birlikte çalıştığım Dr. Susamber DİK ALTINTAŞ'a, Dr. Ceyda YÜCEL DEMİRKIRAN'a, Dr. Meltem FİDAN GÜNDÜZ'e ve diğer bölümlerdeki tüm asistan arkadaşlarıma,

Servis, solunumsal yoğun bakım, bronkoskopi ünitesi, poliklinik ve uyku laboratuvarında birlikte çalışmaktan mutlu olduğum ve ayrılmaz parçamız olan bütün hemşirelerimiz, sekreterlerimiz ve personelimize,

Hayatım boyunca hep yanımda olan ve bugünlere ulaşmamda en büyük paya sahip olan aileme,

Bana daima destek olan ve yanımda olan Serap ERDÖNMEZ'e

Hem hastane hem de dışarda birlikte olmaktan mutluluk duyduğum, Zonguldak'ı daha da güzelleştiren arkadaşlarım İdil ve Mehmet Ali TÜZ'e,

Ve bir hekim olarak daima yolundan ayrılmayacağım ulu önder MUSTAFA KEMAL ATATÜRK'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Dr. Oytun AYDOĞAN

Zonguldak, 2018

## ÖZET

**Oytun Aydoğan, Bronkoalveolar lavaj sıvısında hücre sayımının farklı metotlar arasında karşılaştırılması. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2018**

**Amaç:** Bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı diferansiyel hücre paterni, diffüz parankimal akciğer hastalıklarının tanısız yaklaşımında ve ayırıcı tanılarını daraltmada kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı optik mikroskopiye göre daha hızlı ve daha objektif bir yöntem olan akım sitometri (FCM) ile BAL hücresel profilinin elde edilmesi ve sonuçlarının optik mikroskopi ile elde edilenle karşılaştırılarak optik mikroskopi yerine kullanımının uygunluğunu ya da üstünlüklerini belirleyebilmektir.

**Gereç ve Yöntem:** Araştırma 2017 ve 2018 yılında difüz parankimal akciğer hastalığı nedeni ile tanı amaçlı bronkoalveolar lavaj uygulanan ve BAL sıvıları hem optik mikroskopta hem de FCM cihazında analiz edilen hastalar geriye dönük olarak incelenerek yapıldı.

**Bulgular:** Wilcoxon işaretli sıra testi ile FCM ve optik mikroskopideki lenfosit ve eozinofil sayıları arasındaki farkların anlamlı olduğu görüldü (sırasıyla  $p=0.005$ ,  $p<0.001$ ). Bununla birlikte hem alveolar makrofajlar hem de nötrofillerde FCM ve optik mikroskopi arasındaki fark anlamlı değildi (sırasıyla  $p=0.820$ ,  $p=0.280$ ). Bland-Altman analizi ile akım sitometrinin optik mikroskopi ile karşılaştırıldığında lenfosit sayılarını %34.4 oranında ve yine nötrofil sayısını %14 oranında düşük tahmin ettiğini belirledik. Bununla birlikte alveolar makrofaj popülasyonlarının dağılımı homojendi. Çok değişkenli nokta ve çizgi diyagramları, sayılan eozinofiller hesaba katıldığında eozinofiller için akım sitometri ile optik mikroskopi arasında belirgin bir fark olmadığını gösterdi.

**Sonuç:** Çalışmamız, uygun klinik şartlar ve ulaşılabilirlik durumunda daha hızlı sonuç veren ve alveolar hücre popülasyonunu daha iyi yansıtabilen FCM nin BAL sıvısının diferansiyel hücre profili analizinde güvenli olarak kullanabileceğini işaret etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Bronkoalveolar lavaj, diferansiyel hücre sayımı, optik mikroskopi, akım sitometri

## ABSTRACT

**Oytun Aydoğan, Comparison of the different methods for counting cell in the bronchoalveolar lavage fluid. Zonguldak Bülent Ecevit University, School of Medicine, The Department of Pulmonary Medicine, Medical Thesis, 2018**

**Objectives:** Differential cell pattern of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid is used in the diagnostic approach of diffuse paranchymal lung diseases and in narrowing the differential diagnoses. The purpose of this study is to obtain the cellular profile of the BAL fluid by flow cytometry which is faster and more objective compared to optical microscopy and to determine the suitability or advantage of using flow microscopy instead of optical microscopy.

**Materials and Methods:** The study was performed by retrospectively reviewing on patients who underwent bronchoalveolar lavage for diagnostic purpose due to diffuse parenchymal lung disease between 2017 and 2018, and whose BAL fluids were analyzed both in optical microscopy and in flow cytometry device.

**Findings:** Wilcoxon signed rank test showed significant differences between FCM and optical microscopy in terms of the number of lymphocyte and eosinophil ( $p=0.005$ ,  $p<0,001$  respectively). However, the difference between FCM and optical microscopy interms of both the number of alveolar macrophages and the number of neutrophils is not significant ( $p=0.820$ ,  $p=<0,280$  respectively). With Bland-Altman analysis, we found that flow cytometry predicts the number of lymphocyte by 34.4% and the number of neutrophil by 14% lower, when compared to optical microscopy. However, the distribution of alveolar macrophage populations was homogeneous. Multivariate point and line diagrams show that there is no significant difference between flow cytometry and optical microscopy for eosinophils when eosinophils are considered.

**Results:** Our study indicates that in the case of appropriate clinical conditions and accessibility, FCM which provides faster results and better reflect the alveolar cell population can be used safely in differential cell profile analysis of BAL fluid.

**Keywords:** Bronchoalveolar lavage, differential cell count, optical microscopy, flow cytometry

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Bronkoalveolar Lavajın Kısa Tarihi ve Diffüz Parankimal Akciğer Hastalıklarında Kullanımı.....	2
2.2. Bal Sıvısı Hücresel Analizi Prosedürü.....	3
2.2.1 BAL tekniğinde hastanın pozisyonu.....	3
2.2.2 Lavaj yapılacak bronkopulmoner segment:.....	3
2.2.3. Prosedür sırasında emme basıncı.....	4
2.2.4. BAL için her bir alikuoat içerisine verilen salin miktarının hacmi.....	4
2.2.5. Lavaj dönüşü değişkenliği .....	4
2.2.6. BAL prosedürünün güvenlik özellikleri .....	5
2.2.7. BAL sıvı örneğinin laboratuvara taşınması .....	5
2.2.8. Laboratuar tarafından BAL sıvısı örneğinin işlenmesi.....	6
2.3. İnterstisyel Akciğer Hastalıklarının Tanısında Bal Sıvısı Hücresel Analizi.....	7
2.3.1. Makroskopik analiz.....	7
2.3.2. Alınan BAL sıvısında hücre diferansiyel sayımı .....	8
2.4. Bal Sıvısında Çalışılan Hücreler ve Özellikleri .....	12
2.4.1. Alveolar makrofajlar .....	12
2.4.2. Lenfositler .....	15
2.4.3. Nötrofiller.....	18
2.4.4. Eozinofiller.....	20
2.5. Bal Sıvısı Hücresel Bulgularının İnterstisyel Akciğer Hastalıklarda Klinik Kullanımı.....	22
2.5.1. İdiopatik Pulmoner Fibrozis (İPF) .....	22

2.5.2. Nonspesifik interstisyel pnömoni (NSİP) .....	23
2.5.3. Kriptojenik Organize Pnömoni (KOP) .....	24
2.5.4. Eozinofilik interstisyel akciğer aastalıkları (EAH) .....	24
2.5.5. İnterstisyel akciğer hastalığı olan deskuamatif interstisyel pnömoni ve respiratuar bronşiyolit .....	25
2.5.6. Akut interstisyel pnömoni .....	26
2.5.7. Lenfoid interstisyel pnömoni (LİP).....	27
2.5.8. Sarkoidoz .....	27
2.5.9. Hipersensitivite pnömonisi.....	28
2.5.10. Bağ dokusu hastalığı (BDH) / kollajen vasküler hastalığa (KVH) bağlı interstisyel akciğer hastalığı.....	30
2.5.11. Mesleki interstisyel akciğer hastalığı .....	30
2.5.12. Spesifik interstisyel akciğer hastalıkları (İİP Olmayan) .....	32
2.5.13. Alveolar Hemoraji Sendromları .....	34
2.5.14. İlaça Bağlı İnterstisyel Akciğer Hastalığı .....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	37
3.1. Hastanın Hazırlanması .....	37
3.2. BAL İşleminin Uygulanması .....	38
3.3. BAL Sıvısının Hücresel Analizinin Yapılması.....	38
3.4. İstatistiksel Analiz.....	41
4. BULGULAR .....	42
5. TARTIŞMA .....	46
5.1. Çalışmanın Sınırlamaları.....	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	55
7. KAYNAKÇA .....	56
8. EKLER.....	67
EK 1: Etik Kurul Onayı.....	67



## SİMGELER VE KISALTMALAR

AİP	: Akut İnterstisyel Pnömoni
ATS	: American Thoracic Society
BAL	: Bronkoalveolar Lavaj
CD	: Cluster of Differentiation
DAH	: Diffüz Alveolar Hemoraji
DİP	: Deskuamatif İnterstisyel Pnömoni
EAH	: Eozinofilik Akciğer Hastalığı
FCM	: Flow Cytometry
HLA	: Human Leukocyte Antigen
HP	: Hipersensitivite Pnömonisi
İAH	: İnterstisyel Akciğer Hastalığı
İİP	: İdiyopatik İnterstisyel Pnömoni
İPF	: İdiyopatik Pulmoner Fibrozis
KOP	: Kriptojenik Organize Pnömoni
LİP	: Lenfositik İnterstisyel Pnömoni
NSİP	: Nonspesifik İnterstisyel Pnömoni
OF	: Otofloresans
PAP	: Pulmoner Alveolar Proteinozis
PLCH	: Pulmonary Langerhans Cell Histiocytosis
RB	: Respiratuar Bronşiyolit
SSC	: Side Scatter Chanel
YÇBT	: Yüksek Çözünürlüklü Bilgisayarlı Tomografi

## TABLolar LİSTESİ

### Sayfa

Tablo 1: Normal erişkinde BAL sıvısı diferansiyel hücre sayıları .....	10
Tablo 2: Akım sitometri ile ölçümü yapılabilecek hücresel özellikler .....	11
Tablo 3: Akım sitometri cihazında bulunan dedektörler.....	12
Tablo 4: Makrofajlar ve markerları.....	15
Tablo 5: Lenfosit grupları ve özellikleri .....	17
Tablo 6: Nötrofil granülleri ve serbest bıraktıkları proteinler.....	20
Tablo 7: Granülosit (Nötrofil ve Eozinofil) İşaretleyicileri .....	22
Tablo 8: Çalışmaya Alınan Nüfusun Demografik Özellikleri ve Tanıları.....	37
Tablo 9: Çalışmada Hücreleri Sınıflandırmada Flow Stimoteride Kullanılan Monoklonal Antikorlar ve Dedektörler .....	40
Tablo 10: Tanımlayıcı İstatistikler, Lökosit Sayı Oranlarının Ortalama Değerleri ...	42

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa

- Şekil 1: Akım Sitometri Cihazı Çalışma Prensibi..... 11
- Şekil 2: a) Alveol duvar ve alveolar hücreler b) Alveolar makroajlar; lipoid pnömonili bir hastada ..... 12
- Şekil 3: Sarkoidozlu bir hastanın BAL sıvısında lenfositler (siyah ok)..... 16
- Şekil 4: BAL sıvısında nötrofiller ..... 19
- Şekil 5: BAL sıvısında eozinofiller (E)..... 21
- Şekil 6: Flow Sitometri de BAL sıvısı diferansiyel hücre sayımı grafikleri. a) Mantıksal Kapılama b) CD45 ve CD14 e göre alveolar makrofaj, nötrofil, lenfositlerin hesaplanması c) CD45+ ve SSC da düşük granülositli lenfositler d) CD9- ve CD15+ olan nötrofiller e) CD9+ ve SSC de yüksek granülositli eozinofiller ..... 39
- Şekil 7: Optik mikroskopi ve FCM arasındaki Bland-Altman analizi. X eksenini, optik mikroskop ile elde edilen sayıları temsil eder ve Y eksenini, her bir BAL lökosit popülasyonu için her iki yöntemle elde edilen değerler arasındaki fark yüzdesini gösterir: A: Makrofajlar, OMM: optik mikroskopi makrofaj, FSM: flow sitometri makrofaj ..... 43
- Şekil 8: Optik mikroskopi ve FCM arasındaki Bland-Altman analizi. X eksenini, optik mikroskop ile elde edilen sayıları temsil eder ve Y eksenini, her bir BAL lökosit popülasyonu için her iki yöntemle elde edilen değerler arasındaki fark yüzdesini gösterir: B: Lenfositler, C: Nötrofiller, OML: optik mikroskopi lenfosit, FSL: flow sitometri lenfosit, OMN: optik mikroskopi nötrofil, FSN: flow sitometri nötrofil ..... 44
- Şekil 9: Eozinofil popülasyonu için çoklu değişkenler (sitometri ve optik mikroskopi) için nokta ve çizgi diyagramları. Diyagram, sitometri ve optik mikroskopi ile ölçülen her bir numunenin değerini temsil eder. OME: optik mikroskopi eozinofil, FSE: Flow sitometri eozinofil. .... 45

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bronkoalveolar lavaj (BAL) akciğerin infeksiyöz (tüberküloz, mantar, virus, bakteri gibi) ve infeksiyöz olmayan patolojilerinde (interstisyel akciğer hastalıkları, alveolar hemorajiler, kanserler gibi) kullanılan bir örnekleme tekniğidir. Distal bronşiollelerin ve gaz değişim birimlerinin hücresele ve hücresele olmayan bileşenlerini örnekler. BAL sıvısı hücresele analizi şüphelenilen hastalığın tanısal sürecinde bize önemli faydalar sağlar. BAL sıvısı diferansiyel hücre paterni sonuçları tıbbi öykü, fizik muayene ve radyolojik bulgular bağlamında ele alındığında tanı koyabilme oranı artar ve ayırıcı tanıları daraltabilir. BAL sıvısı diferansiyel hücre sayımı altın standart olarak optik mikroskopi yöntemi ile yapılır. Bu yöntem zaman alıcıdır ve rutin olarak sayılan düşük hücre sayısı, öznel ve sitoplazma örneklerinin okunmasını zorlaştıran bronşiyal epitelyal ve skuamoz epitelyal kontaminasyon hücreleri gibi diğer nonlökosit hücrelerin varlığı nedeniyle değişkenlik gösterebilir.

Akım sitometri, süspansiyon halindeki hücreleri veya partikülleri sıvı bir sistem içerisinde tek tek geçerken fiziksel ve/veya kimyasal özellikleri ile analiz eden bir cihazdır. Süspansiyon halinde hazırlanan ve monoklonal antikorlar veya florokromlar ile boyanan hücrelerden yayılan floresan ışığı bir araya getirilir, uygun dedektörler ve filtreler tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak sinyallere dönüştürülür. Bu sinyaller bilgisayar ortamına aktarılarak hücrelerin büyüklüğü, granülaritesi, iç yapısı ve floresan yoğunluğu hakkında bilgi verir. Akım sitometri BAL sıvısında uygulanarak diferansiyel hücre paternleri belirlenebilmektedir.

Akım sitometri ile BAL sıvısı hücresele profilinin belirlenmesi hakkında bilgi literatürde sınırlıdır. BAL örneklerinde FCM kullanan çalışmaların çoğu, sadece lenfosit alt gruplarına odaklanarak BAL analizine yönelik önyargılı bir görüş sağlamıştır. Bu çalışmanın amacı BAL sıvısının hücresele profilinin daha hızlı ve optik mikroskopiye göre daha objektif bir yöntem olan FCM ile elde edilmesi ve sonuçlarının optik mikroskopisi ile elde edilen bilgilerle karşılaştırılarak optik mikroskopisi yerine kullanımının uygunluğunu ya da üstünlüklerini belirleyebilmektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Bronkoalveolar Lavajın Kısa Tarihi ve Diffüz Parankimal Akciğer Hastalıklarında Kullanımı

Rijit bronkoskoptan geçen bir kateter aracılığıyla salin solüsyonu ile bronşiyal irrigasyon ilk olarak 1927'de bildirilmiş ve 1932'de Stitt tarafından "bronş lavajı" adı verilmiştir (1). Başlangıçta septik akciğer hastalığı veya pulmoner alveolar proteinozis için bir tedavi olarak kullanılmasına rağmen (2), 1960'lı yıllarda çeşitli hayvan modellerinde alt solunum yolu immünitelerini incelemek için bronş lavajı uygulanmış ve insan akciğerinde 1960'ların ve 1970'lerin sonlarında uygulanmıştır (3). Akciğerin belirlenmiş bir kısmının salin ile lavajı bronkoalveolar lavaj olarak tanımlanmış ve 1980-1990'larda fleksibl fiberoptik bronkoskopun klinik kullanımı ile yaygınlaşmıştır.

BAL, normal bireylerin veya enfeksiyöz ve/veya enflamatuar alt solunum yolu hastalıkları olan hastaların bronşiyal/alveolar hücreleri ve salgıları temin etmek için kullanılır. Birçok faktör, geri kazanılan sıvı miktarını ve/veya alınan bronkoalveolar epitelyal yüzey sıvısının hücresel profilini etkileyebilir. BAL sıvısındaki çekirdekli immün hücrelerin diferansiyel sayısındaki paternler, sarkoidoz gibi bazı interstisyel akciğer hastalıkları (İAH) formlarıyla oldukça iyi korelasyon göstermesine rağmen, suboptimal özgüllükleri, İAH'da bir tanı aracı olarak kullanımını sınırlandırmıştır.

Bronkoalveolar lavaj (BAL) güvenli, kolay uygulanır ve iyi tolere edilen bir prosedürdür. BAL'ın deneyimli bronkoskopi uzmanları tarafından güvenle uygulanabileceği bildirilmiştir. BAL tipik olarak, normal kontrol deneklerinden farklı olarak İAH hastalarında hücresel (çekirdekli immün hücreler) ve hücresel olmayan bileşenlerde varyasyonları ortaya çıkarır ve birçok klinisyen, İAH'ın ayırıcı tanısını daraltmak için bir kılavuz olarak BAL hücresel analizini kullanır. BAL'ın tek başına tanısallık değeri düşük olmasına rağmen, BAL hücresel analizi standart protokollere göre uygulandığında, YÇBT gibi yardımcı tanı testlerinden elde edilen diğer bilgilerin kullanımı ve uygun klinik ile birlikte düşünüldüğünde ayırıcı tanıları büyük ölçüde daraltmakta ve hasta için risk oluşturan daha invaziv tanısallık prosedürlere ihtiyacı azaltmaktadır.

## **2.2. Bal Sıvısı Hücresel Analizi Prosedürü**

Altta yatan bir hastalık süreci veya sigara içimi BAL analizini etkileyebilir. Hava yolu obstruksiyonu BAL sıvısı dönüşünde değişikliklere yol açabilir. Bunun nedeni, sıvı geri kazanımını kolaylaştırmak için negatif basınç uygulandığında daralmış hava yollarındaki aspirasyon sıvısının geri alınımının zorlaşmasıdır. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan hastalarda hava yolu kollapsı değişkendir; sıvıyı aspire etmek için kullanılan negatif basınç ne kadar büyük olursa, belirgin hava yolu kollapsının meydana gelmesi daha muhtemeldir ve BAL sıvısının geri dönüşünü olumsuz olarak etkiler. Astımdaki hava yolu obstruksiyonu, prosedürün kendisi tarafından indüklenebilir (4).

### **2.2.1 BAL tekniğinde hastanın pozisyonu**

Hastanın pozisyonu lavajı etkileyebilir ve yerçekimi bağımlı akciğer bölgelerinden lavaj dönüşünü engelleyebilir. BAL'da dik, yarı yatar veya supin pozisyonlamanın etkilerini karşılaştıran çalışma yoktur. Pozisyonlama, hastayı etkileyen klinik duruma göre belirlenmeli ve prosedür raporunda belirtilmelidir.

### **2.2.2 Lavaj yapılacak bronkopulmoner segment:**

BAL için akciğerlerin en uygun alanının veya alanlarının seçilmesi önemlidir. 1970'lerde ve 1980'lerde, İAH'ların ana gruplarındaki BAL çalışmalarına ait çok sayıda çalışma, farklı BAL hücre sayımı bulgularının, standart lavaj bölgesi olarak sağ orta lob veya sağ alt lob seçilmesinin farklı merkezlerde çok benzer olduğunu göstermiştir. Üst lobu tutan hastalıklarda üst lob bölgelerinden BAL yapılmasının gerekip gerekmediği tartışılmış, ancak bu yaklaşım, standart bir prosedürün eksikliğinden dolayı kabul görmemiştir.

Son yıllarda YÇBT'nin kullanımı ve idiyopatik interstisyel pnömonilerin (İİP) yeni sınıflandırılmasında hastaların akciğerlerindeki YÇBT paternlerindeki farklılıkların, spesifik bir İAH ile ilişkili inflamatuvar hücre profilini daha doğru yansıtabilen BAL için hedef bölgeleri tanımlamakta yararlı olabileceği ve tanı

olasılığını artırabileceği görülmüştür. Örneğin, buzlu cam alanları daha aktif inflamasyon alanlarını yansıtabilir ve lavaj için iyi hedef alanları temsil edebilir.

Solunum yolu enfeksiyonlarının değerlendirilmesinde lavaj bölgesi varyasyonu önemli bir faktördür ve BAL sıvısının maksimal tutulum bölgesinden alınması gerekmektedir. Fırsatçı akciğer enfeksiyonlarında (diffüz pulmoner infiltratlar ile), P. carinii pnömonisi olan hastalarda BAL uygulandığında, üst loblardan lavaj yapılmasının geleneksel sağ orta lob veya lingualdan daha yüksek bir organizma verimine sahip olduğu görülmüştür (5).

### **2.2.3. Prosedür sırasında emme basıncı**

Emme basıncı çok yüksek olduğunda hava yolları çökmektedir. Spesifik bir teknikten bağımsız olarak, solunum yolunun görsel muayenesi, bronkoskopistin aspirasyon işlemi sırasında hava yolu çöküşünü izlemesini sağlar. Negatif emme basıncının 100 mm Hg'nin altında kalacak şekilde ayarlanması, görünür hava yolu çöküşünü önlemek için önerilmektedir.

### **2.2.4. BAL için her bir alikot içerisine verilen salin miktarının hacmi**

BAL sırasında verilen salin hacmi BAL sıvısı dönüşünü ve BAL sıvısı örneğinin hem hücresel hem de protein içeriğini etkiler. 60 ml'lik iki alikot verildikten ve aspire edildikten sonra, hücreler ve protein geri dönüşleri tutarlı hale gelir. İAH ve kontrol denekleri üzerinde yapılan bir çalışmada, en az 120 ml sıvıya kadar fark görülmemiştir (6). Bronkoalveoler epitelyal yüzeyler üzerinde yeterli miktarda hücre ve proteinleri örneklemek için en azından toplam 120 ml serum fizyolojik verilmesi önerilmektedir.

### **2.2.5. Lavaj dönüşü değişkenliği**

Geri alınan serum fizyolojik yüzdesi de değişkendir. Uygulanan hacmin %5'inden daha azına ulaşırsa, alveolar örnekleme muhtemelen yetersizdir. Optimal örnekleme için verilen sıvı hacminin en az %30'unun geri alınması gerekmektedir. Küçük hacim

dönüşleri (özellikle toplam verilen hacminin %10'u) uygun BAL numuneleri olarak kabul edilmemelidir.

Akciğerin içine verilen ve kalan hacmin çok büyük olması durumunda lavaj kesilmelidir (örneğin, her seferde %5'lik bir geri dönüş). Verilen ve aspire edilen hacimler arasındaki fark önemli ölçüde (örneğin, 100 ml'den büyük) artarsa, bu lavaj alanında ilave alikotlar verilmemelidir, ancak hasta prosedürü tolere ederse ayrı bir alanda ikinci bir lavaj yapılabilir.

#### **2.2.6. BAL prosedürünün güvenlik özellikleri**

Hem araştırmalarda hem de astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı, akut respiratuvar distres sendromu ve ventilatörle ilişkili pnömonisi olan hastalarda bronkoalveoler lavaj prosedürünün uygulanmasını değerlendiren klinik uygulamalarda BAL iyi bir güvenliğe sahiptir. BAL prosedürüne bağlı en yaygın iki komplikasyon ateş ve hipoksemdir, fakat BAL ile ilişkili bu gibi advers olaylar neredeyse her zaman kendi kendini sınırlamaktadır ve bir dereceye kadar daha büyük lavaj hacimlerinin kullanımına bağlıdır (7, 8). Bununla birlikte, BAL prosedürü, dolaşımdaki pro-enflamatuar sitokinlerde artış, periferik kan nötrofillerindeki artış, akciğere nötrofillerin göçü ve geçici sekestrasyonu ve demir homeostazında değişiklikler ile akut faz reaksiyonlarını hızlandırabilir (9-11). BAL prosedürünün, akut inflammatuar yanıtı artırabileceği, ateş ve hipoksemiye tetikleyebileceği endişesine rağmen, ventrikül ilişkili pnömonisi (VİP) olan hastalar, akut respiratuvar distres sendromlu (ARDS) hastalar, akciğer transplant alıcıları, immün sistemi baskılanmış hastalar, bozulmuş koagülasyonu olan hastalar ve solunum yetmezliği gelişmiş hastaları değerlendirmek için kullanıldığında güvenilirliği iyidir ve daha invaziv işlemlerin gereksinimini azaltır.

#### **2.2.7. BAL sıvı örneğinin laboratuvara taşınması**

BAL sıvısı örnekleri, kap yüzeylerine (örneğin silikon kaplı cam veya polipropilen veya süspansiyon doku kültürü için tasarlanmış diğer plastikler) hücre yapışmasını desteklemeyen kaplarda parçalar halinde toplanmalıdır.



➤ Eğer laboratuvar aynı tesiste yer alıyorsa BAL sıvısı numuneleri oda sıcaklığında 'taze' olarak nakledilebilir ve eğitimli laboratuvar personeli ile BAL sıvısı alımı ile laboratuvara gönderilmesi arasında minimum gecikme vardır, bu da analizler sırasında hücre canlılığının korunma olasılığını artırır.

➤ Taze BAL sıvısının alınmasını takiben 30-60 dakika geçtikten sonra laboratuvar da beklenen gecikme için, numuneler +4°C'de (ör. buzda) nakledilmeli ve 1 saat içinde teslim edilmelidir.

➤ Alınan BAL sıvısı örnekleri, BAL hücre analizi için dondurulmuş şekilde ve/veya kuru buz ile taşınmamalıdır.

➤ Orijinal lavaj salininde 1 saatten fazla taşıma süreleri önerilmez; hücreler, daha uzun süreler boyunca onları korumak için uygun bir doku kültür ortamına aktarılmalıdır (örneğin MEM+25 mM HEPES veya RPMI 1640+25mM HEPES).

#### **2.2.8. Laboratuvar tarafından BAL sıvısı örneğinin işlenmesi**

➤ Makroskopik olarak mukuslu örnekler gerekirse 4x4 gevşek gazlı bezden geçirilebilir.

➤ BAL sıvısı, hücre bütünlüğü korumak ve yeniden süspansiyona imkan vermek için uygun bir hızda (örneğin 10 dakika boyunca 250-300 g) santrifüjlenmelidir.

➤ Hücre süspansiyonları 4°C'de soğutulmalı ve hemen analiz edilmediği takdirde doku kültür ortamında (örn. MEM + 25mM HEPES) yeniden süspansiyon edilmelidir.

➤ Çekirdekli hücre sayıları hemasitometre yoluyla alınmalıdır.

➤ Hücre canlılığı belirlenmelidir (Tripan mavisi dışlama) ve rapor edilmelidir.

➤ 24 saatten fazla bekletilen örnekler analiz için uygun değildir.

➤ Diferansiyel hücre sayımları, boyama (Wright-Giemsa veya May-Grunwald-Giemsa) ile sitosantrifüjleme ve en az 400 hücre sayımı yoluyla gerçekleştirilmelidir.

➤ Mast hücreleri belirlenmeyeceğinden, Diff-Quick boyaması yapılmamalıdır.

- İAH şüphesi olan hastalarda BAL sıvısında lenfosit alt kümesi analizi, BAL hücresel analizinin rutin bir bileşeni değildir, gereklilik durumunda yapılır.
- Lenfosit işaretleyicileri (B veya T lenfositler, Langerhans hücreleri) için akım sitometrisi veya immünohistokimya, klinik olarak belirtildiği gibi veya ilk BAL hücresel bulgularından şüphe edildiğinde yapılmalıdır ve laboratuvar bu ek analizin olasılığına karşı uyarılmalıdır.
- Primer alveolar proteinozun klinik şüphesi olduğunda veya başlangıç BAL görüntülerine bağlı olduğu düşünüldüğünde, periyodik Asit Schiff boyaması yapılmalıdır (alveolar proteinozis sedimenti).
  - Aspirasyon şüphesi varsa Oil red O boyama yapılmalıdır.
  - Kanama şüphesi varsa ve/veya başlangıç BAL görüntülerinde hemosiderin yüklü makrofajların olması şüphesi varsa hemosiderin boyası yapılmalıdır.
  - Malignite için şüpheli hücrelerin yorumlanması hematopatolog veya sitopatolog tarafından yapılmalıdır.

### **2.3. İnterstisyel Akciğer Hastalıklarının Tanısında Bal Sıvısı Hücresel Analizi**

#### **2.3.1. Makroskopik analiz**

BAL sıvılarının görünümü, İAH'ın nedeni ile ilgili önemli ipuçları verebilir. BAL prosedürü sırasında her sefer de geri alınan BAL sıvısındaki kanlı renk değişiminin yoğunluğunda ilerleyici bir artış gösteren kan varlığı, pulmoner/alveoler hemoraji sendromunu güçlü bir şekilde öngörebilir (12). BAL sıvısı açık kahverengi/bej rengi bir görünüme sahip bulanık/süt görünümde ise ve bir kapta bekletildikten sonra kabın dibine çöken beyazımsı kabarık görünüm varsa, pulmoner alveolar proteinoz tanısını destekler (13). Bulanık materyal mevcutsa ve sıvıyı temizlemek için düşük hızlı santrifüjleme gerekiyorsa, mikrolitiazis tanısı öngörülebilmektedir (14). Yağlı materyal, BAL sıvısının üzerinde tabakalaşırsa, lipoid pnömoni varlığı öngörebilir. Santrifüjlemeden sonra bir siyah hücre yumağının varlığı, kişinin muhtemel bir sigara içicisi olduğunu veya solunan havada önemli miktarlarda karbonlu maddeye maruz kaldığını gösterir.

### 2.3.2. Alınan BAL sıvısında hücre diferansiyel sayımı

Başarılı hücre analizi için en önemli koşul, BAL sıvısı toplandıktan sonra hücre canlılığının sürdürülmesidir. Bir BAL yapıldığında alveoler boşluğun yıkanması için kullanılan tuzlu çözeltiler, düşük pH'a sahiptir ve besin bakımından zayıftır ve uzun bir süre boyunca hücrelerin canlılığının sürdürülmesinde yetersiz kalmaktadırlar. Numunenin hemen incelenmemesi durumunda, salin hücresiz süpernatantın MEM (Minimum Essential Media) gibi doku kültür ortamı ile 25 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) tamponu veya RPMI 1640 ile taşınmasından önce HEPES tamponu ile toplanması ve yer değiştirmesi çok daha iyi örnek stabilitesi sağlar. Numunenin santrifüjlenmesi, süpernatantın uzaklaştırılması ve ortamda yeniden süspansiyonun kullanılması tercih edilen takviye yöntemidir. Numunenin soğutulması ayrıca hücresel bozulmayı geciktirecektir ve numune analizindeki gecikme 8 saatten fazla olduğunda (örneğin, bir gece) tavsiye edilir. 24 saatten fazla bekleyen numuneler analiz için genellikle uygun değildir.

Laboratuvara alındıktan sonra, sıvının kap içerisindeki görünümünde aşırı mukus varsa, hücresel elemanların sıvı içinde bulunan mukustan ayrılması gerekebilir. Mukusun çıkarılması için yaygın olarak kullanılan yöntem, numuneyi tek bir steril gazlı bezle filtre etmektir, fakat bu pek önerilmemektedir, çünkü bazı hücre tiplerinin kaybı meydana gelebilir. Ara sıra görülen çok fazla mukuslu numuneler için, çökeltilmiş hücre birikiminin, santrifüj işleminden sonra sıvı süpernatantı uzaklaştırmak ve toplamak için dithiothreitol ile muamele edilmesi yöntemi, materyal kaybı olmaksızın mukusun çıkarılması için alternatif bir yöntem olarak önerilmektedir. Hücresel elemanlar daha sonra 5 dakika boyunca 250-300 g'de santrifüj ve ardından kalsiyum ve magnezyumdan yoksun Hank Dengeli Tuz Çözeltisi (HBSS) veya fosfat tamponlu salin (PBS) gibi dengeli bir elektrolit çözeltisinde MEM + 25mM HEPES ile yıkanmalıdır.

Hücre analizi için minimum 5 ml BAL sıvısının kullanılması gerekmektedir; bununla birlikte, daha büyük bir miktar (10-20 ml), daha optimal bir örnek sağlar. Daha sonra hücre sayımı, iyice karıştırılmış orijinal sıvı içinde ya da ilk yıkamadan sonra hücrelerin sürekli olarak tekrar tekrar yıkanarak kaybolduğu bir hemositometre kullanılarak çift halinde elde edilmelidir. Kırmızı kan hücrelerinin varlığı not

edilmelidir, ancak rutin olarak numaralandırılmamalıdır. Otomatik hücre sayıcıları, epitelyal hücreleri ve diğer hematopoietik olmayan hücresel elemanları doğru şekilde numaralandıramadıklarından, doğru hücre sayımları sağlaması olası değildir. Stabilizatör hücresel kontrol materyalleri artık vücut sıvısı hücre sayımlarının kalite kontrolü için ticari olarak temin edilebilir. Çekirdekli hücrelerin canlılığı, özellikle örneklerin yeni alınmadığı ve analiz edilmediği takdirde, bir analiz sıvısında Trypan Mavisi kullanılarak tahmin edilebilir. İlk numunede çekirdekli hücrelerin sayısı, hücresel konsantrasyon ve canlılık yüzdesi, daha sonra ilk ve yıkama sonrası hacimlerinin bilindiği varsayılarak hesaplanabilir. %90'dan fazla bir canlılık kabul edilebilirdir ve %80'den az olması, önemli örnek uyuşmama olasılığını gösterir ve bu nedenle hücresel analizler için suboptimal olarak kabul edilir ve alveollerde izlenen İAH'na ait gerçek hücresel bileşenleri yansıtmayabilir.

Hücresel alt popülasyonların tanımlanması ve sayımı için, altı sitosantrifüj preparatının hazırlanması gerekmektedir. Bununla birlikte, sitosantrifüj tekniğinin, özellikle sayıları yüksekse lenfositlerin sayısını düşürebildiği kabul edilir (15), sitosantrifüj, klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan bir tekniktir, hızlıdır ve diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında yüksek hücresel detay sağlar. Havada kurutulmuş preparatlardan ikisi WrightGiemsa veya May-Grunwald-Giemsa ile boyanmalı ve daha sonra bir lamel ile korunmalıdır. Mast hücreleri zayıf bir şekilde görüldüğü için Diff-Quick boyaması suboptimaldir. Düşük büyütme (200x) altında, morfolojik anormalliklerin varlığı tanımlanabilir (örneğin toz partikülleri, mikroorganizmalar, malign hücrelerin kümeleri veya alveolar proteinozu düşündüren hücresel agregatlar). Yüksek büyütme (500x) altında, makrofajlar, lenfositler, nötrofiller ve eozinofiller dahil olmak üzere, çekirdekli BAL immün hücrelerinin bir diferansiyel sayımı gerçekleştirilmelidir. Toplamın %10'undan daha azını temsil eden popülasyonlar için istatistiksel olarak anlamlı bir tahminde bulunmak amacıyla, periferik kandaki farklı lökosit sayımları için önerildiği gibi 400 hücre değerlendirilmelidir (16). Bakterilerin veya diğer organizmaların yanı sıra malign hücrelerin varlığı da not edilmelidir. Kalan diğer slaytlar, klinik öykü veya morfolojik bulgular ile öngörülen antiteler için, daha özel boyaların (örneğin hemosiderin yüklü makrofajlar için demir boyaması, alveolar proteinoz için PAS, aspirasyon için Oil Red O, mantar enfeksiyonu için gümüş boyama, vb.) potansiyel kullanımı için

korunmalıdır. Distal hava yolları inflamatuvar hücre modellerini doğru olarak yansıttığı düşünülen örnekler %5'ten fazla epitel hücresi içermemelidir.

Sigara içmeyen, klinik olarak normal bireylerdeki diferansiyel sayımlarda, lenfosit  $\leq$  % 15, nötrofil  $\leq$  % 3, eozinofil  $\leq$  % 0.5, mast hücreleri  $\leq$  % 0.5 ve makrofajlar  $>$  % 80 (17) olduğu Tablo 1'de belirtilmiştir. BAL'ın geniş kohort gruplarında yapıldığı diğer çalışmalarda BAL eozinofili (eozinofil  $>$  % 2), BAL nötrofili (nötrofil  $>$  % 4) veya BAL lenfositozunu (lenfositler  $>$  % 14) tanımlamak için farklı cutoff değerleri kullanmıştır (18). Ek olarak, nötrofil ve lenfosit yüzdeleri, klinik olarak normal olan yaşlı bireylerde genç erişkinlere göre daha yüksek olma eğilimindedir (19).

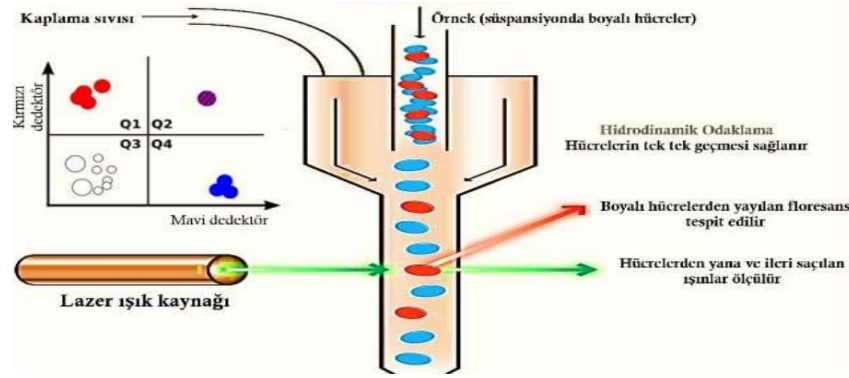
Sağlıklı sigara içenler, BAL sıvısının her 1 ml'si başına makrofaj sayısında 10 kat artışa sahip olabilirler, fakat sigara içmeyenlere kıyasla lenfositlerde artış yoktur. Bu, sağlıklı sigara içmeyenlerle karşılaştırıldığında, makrofajların ( $\geq$  %85) hafif, fakat anlamlı olarak daha yüksek farklı yüzdelik sayılarına ve biraz daha düşük lenfosit yüzdesine sahip olmalarıyla sonuçlanır.

**Tablo 1: Normal erişkinde BAL sıvısı diferansiyel hücre sayıları**

Normal Erişkin (Sigara Kullanmayan)	Bal Diferansiyel Hücre Sayısı
Alveolar makrofaj	$>$ 85%
Lenfosit (CD4+ /CD8+ = 0,9-2,5)	10-15%
Nötrofil	$\leq$ 3%
Eozinofil	$\leq$ 1%
Skvamöz epitel * / silyalı kolumnar epitel †	$\leq$ 5%

### 2.3.3. Akım Sitometrisi (Flow Cytometry)

Akım ya da akış sitometri, akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir (20). Akım sitometrinin temel yaklaşımı; hücrelerin boyut, şekil, DNA ve RNA içeriği, sitoplazmik granüleritesi açısından değerlendirilmesidir. Akım sitometri ile ölçümü yapılabilecek hücresel özellikler Tablo 2'de belirtilmiştir.



**Şekil 1: Akım Sitometri Cihazı Çalışma Prensibi**

Süspansiyon halinde hazırlanan ve monoklonal antikorlar veya florokromlar ile boyanan hücreler tek sıra halinde akış kanalından geçerken lazer ışığı ile karşılaşılır. Saçılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayılan floresan ışığı bir araya getirilir, uygun dedektörler ve filtreler tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak sinyallere dönüştürülür (Şekil 1). Akım sitometride kullanılan dedektörler Tablo 3’de belirtilmiştir. Bu sinyaller bilgisayar ortamına aktarılarak hücrelerin büyüklüğü, granülaritesi, iç yapısı ve floresan yoğunluğu hakkında bilgi verir (21). Lökositlerin ayrılması ise hücre büyüklüğü ve granül yapısına göre yapılmaktadır. Dedektörler ile elde edilen veriler farklı grafikler kullanılarak gösterilebilir. Bu grafikler; nokta alan grafikleri, kontur alan grafikleri, histogram, 3 boyutlu grafik, bölgeler, kapılar ve istatistik olarak sınıflandırılabilir. Bu grafikler ve istatistikler kullanılarak hücreler sınıflandırılır.

**Tablo 2: Akım sitometri ile ölçümü yapılabilecek hücresel özellikler**

Özellikler	Yapısal	Fonksiyonel
<b>İntrinsik</b>	Hücre boyutu ve şekli Sitoplazmik granülerite Pigment içeriği	Hücrenin redoks hali Hücresel canlılık
<b>Ekstrinsik</b>	Yüzey antijenleri Lektin bağlama Total protein Sülfidril grupları DNA ve RNA içeriği Kromatin yapısı	Membran devamlılığı Yüzey elektrik yükü İntrasellüler pH Membran potansiyeli Sitoplazmik yüzey reseptörü Enzim aktivitesi Sitoplazmik matriks yapısı Membran viskozitesi

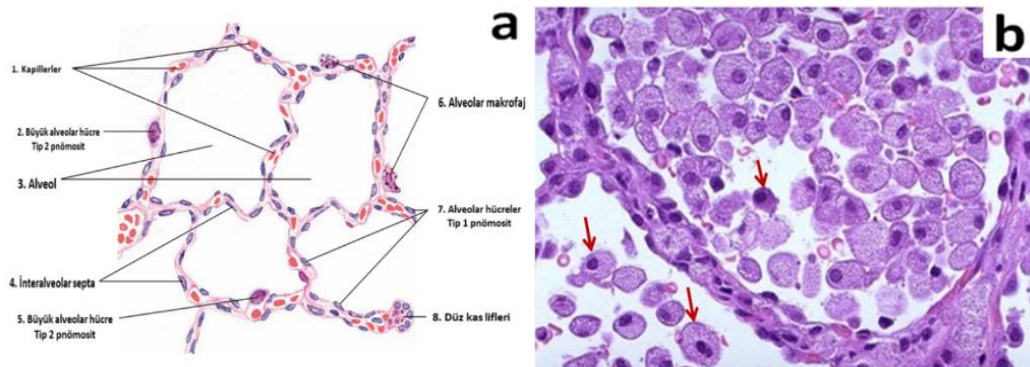
**Tablo 3: Akım sitometri cihazında bulunan dedektörler**

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

## 2.4. Bal Sıvısında Çalışılan Hücreler ve Özellikleri

### 2.4.1. Alveolar makrofajlar

Makrofajlar solunum yolunda en yüksek oranda bulunan immünojen hücrelerdir. En fazla alveollerde (alveolar makrofajlar) ve alveolar epitel ile vasküler epitel (interstisyel makrofajlar) arasındaki boşlukta bulunur (Şekil 2). Pulmoner makrofajların alt popülasyonları, akciğer plevral boşluklarında, vasküler sistemde ve hava yollarında bulunur.



**Şekil 2: a) Alveol duvar ve alveolar hücreler b) Alveolar makroajlar; lipid pnömonili bir hastada**

Alveolar makrofajlar, sağlıklı insan akciğerlerindeki tüm hücrelerin yaklaşık olarak %3-5'ini oluşturmaktadır. Alveoler boşlukta en fazla olan hücre tipi olup, yüksek saflıkta (>%95) bronkoalveolar lavaj ile kolayca geri kazanılabilirler. Alveolar makrofajlar, alveolün iç kısmını kaplayan lipit tabakasında yüzer ve sıklıkla alveolar epitelyal duvarlardan akciğerin lümenine doğru çıkıntı yaparlar (22). Daha önceki literatürlerde, alveolar makrofajların mononükleer fagositer sisteminin bir parçası olduğu ve sadece rutin olarak kan monosit ve kemik iliği prekürsörleri tarafından yenildiği öne sürülmekteydi, fakat alveolar makrofajların embriyonik progenitörlerden veya kan monositlerinden olmak üzere iki kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (23). Çoğu pulmoner makrofajın embriyoenez sırasında akciğere göç eden ve GM-CSF gibi sitokinler tarafından sağlanan sinyallere yanıt olarak doğumdan kısa bir süre sonra uzun ömürlü makrofajlara dönüşen hematopoetik öncü hücrelerin neslinden olduğu görülmektedir (24). Lokal proliferasyon, hasar veya enfeksiyonun ardından makrofaj göçüne katkıda bulunurken, kararlı durum koşullarında, akciğer makrofajları nispeten sessizdir ve in vivo olarak minimal büyüme gösterir.

Alveolar makrofajlar inhale mikroorganizmalara, partikül madde ve çevresel toksinlere karşı akciğerlerin ilk savunma hattı olarak işlev görmektedir ve bu hücrelerdeki hasar, hava kaynaklı bakteriyel enfeksiyon ve toksik maddelere karşı artan konak duyarlılığında önemli bir faktördür. Alveoler makrofajlar, patojen yıkımına yardımcı olan büyük miktarlarda ROS (reactive oxygen species: reaktif oksijen türleri) ve RNS (reactive nitrogen species: reaktif nitrojen türleri)'nin yanı sıra TNFa'nın salınması için enfeksiyöz ve zararlı maddeler tarafından kolayca aktive edilir; böylece monosit sağkalımını arttıran makrofaj-koloni uyarıcı faktör (CSF-1) gibi büyüme faktörleri ve CXCL8 (IL-8), CCL2 (MCP-1) ve CX3CL1 gibi kemokinler akciğere nötrofil ve makrofaj alımını teşvik eder (8-11). Alveoler makrofajlar ayrıca, IL-10 ve CCL18 üreterek solunum yollarının nemlendirilmiş bağışıklık özelliklerinin korunmasına ve prostaglandinlerin ve TGFb'nin salgılanması yoluyla dendritik hücrelerin ve T hücrelerinin doğrudan baskılanmasına yardımcı olur (25). Yerleşik alveolar makrofajların akut akciğer hasarı sonrası devam ettiği, hücresel debris ve apoptotik nötrofilleri temizleyerek inflamasyonun çözülmesine katıldığı, antiinflamatuvar ya da yara onarımı yapan monosit türevli makrofajları topladığı ve



akciğer parankiminin yeniden şekillenmesine yardımcı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca pulmoner dendritik hücelere göre az olmasına rağmen alveolar makrofajlar MHC sınıf II antijenlerini eksprese eder ve antijen sunma aktivitesi gösterirler (26).

Alveolar makrofajlarda belirgin sitoplazma, düzensiz ve bölgesel yerleşimli girintili çekirdekler, çok sayıda küresel mitokondri ve çok sayıda vakuol, lipit damlacıkları, fagositik veziküller ve fagositoz sırasında fagositik keseciklere aktarılan hidrolitik enzimler içeren lizozomlar mevcuttur. Elastazlar, kolajenazlar gibi çeşitli proteolitik enzimler de çoğu dışsal olarak salgılanan lizozomal vesiküller içinde tanımlanmıştır (27).

Optik mikroskopide çapları 8-16 µm arasında değişen agranülositlerdir. Çekirdekleri oval, atnalı ya da böbrek biçimindedir ve genelde kenara yakındır. Çekirdeğin kromatin yapısı diğer lökositlere göre daha az yoğunluktadır, bu nedenle lenfositlere göre daha soluk boyanır. Sitoplazmaları bazofiliktir ve çoğunlukla azurofilik granüller (lizozomlar) içerir.

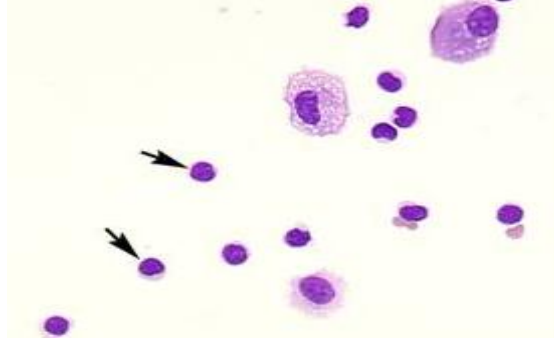
Farklılaşma kümeleri (cluster of differentiation: CD), lökositlerde bulunan hücre yüzey moleküllerinin tanımlanması ve araştırılması için kullanılan bir protokoldür. CD molekülleri, hücre için önemli olan reseptörler veya ligandlar (bir reseptörü harekete geçiren molekül) gibi çeşitli şekillerde hareket edebilir. CD moleküllerinin lökositlerin tanımlanmasında flow (akış) sitometride kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Literatürde alveolar makrofajların tanımlanması için çeşitli markerlar kullanılmıştır ve bu markerlar Tablo 4'de belirtilmiştir (28).

**Tablo 4: Makrofajlar ve markerları**

Tüm Markerlar	M2 Makrofajlar	M1 Makrofajlar	Monositler
CD11b	<b>Sekrete edilen</b>	<b>Sekrete edilen</b>	<b>Yüzey</b>
CD15	IDO	IFN $\gamma$	CD14
CD33	IL-10	IL-1 $\alpha$	CD33
CD40	TGF $\beta$	IL-1 $\beta$	CD172a (SIRP $\alpha$ )
CD63	Surface	IL-6	<b>Doku ilişkili</b>
CD68 (mature)	CD115	IL-12	<b>Makrofajlar</b>
CD80h	CD204	IL-23	
CD85	CD163	TNF $\alpha$	<b>Yüzey</b>
CD86h	CD206 (MMR)	Yüzey	Ax1
CD105h	CD209 (DC-SIGN)	CD16	CD192 (CCR2)
CD115	Fc $\epsilon$ R1	CD16/CD32	CD14
CD169	VSIG4	CD32	CD68
CD195 (CCR5)		CD64	CD115
CD282 (TLR2)	<b>İntrasellüler/Transkripsiyon Faktörü</b>	CD68	CD163
CD284 (TLR4)		CD80	CD206
CD354 (Trem-1)	IRF4	CD86	CD369 (Dectin-1)
CXCL10	STAT6	CD369 (Dectin-1)	HLA-DR
CXCL11		Mer (MerTK)	CD273 (PD-L2)
CXCL9		MHCII	
GPNMB		<b>İntrasellüler/Transkripsiyon Faktörü</b>	<b>İntrasellüler</b>
<b>Olgunlaşmış makrofaj marker</b>		IRF5	NOS2
MIP-2 $\alpha$ (CXCL2)		STAT1	

#### 2.4.2. Lenfositler

Çapları 6-8  $\mu$ m arasındadır, fakat 18  $\mu$ m ye kadar çaplara ulaşabilirler. Çekirdekleri yuvarlaktır ve çentikli olabilirler (Şekil 3). Çekirdekleri yoğun kromatin içerdiği için yaymalarda oldukça koyu boyanırlar. Sitoplazmaları hafif bazofiliktir ve yaymalarda açık mavi renk alır. Poliribozomlar lenfositlerde belirgin bir özelliktir ve bir elektron mikroskobu ile görülebilir. Lenfositlerin yaşam süreleri farklılık gösterir. Bazı lenfositler birkaç gün, bazıları da birkaç yıl yaşayabilirler. Lenfositler diapedez yoluyla dokulardan kan dolaşımına tekrar dönebilen tek lökosit türüdür.



**Şekil 3: Sarkoidozlu bir hastanın BAL sıvısında lenfositler (siyah ok)**

Lenfositler arasında doğal öldürücü hücreler (natural killer: NK) (hücre aracılı, sitotoksik doğuştan bağışıklıkta işlev gören), T hücreleri (hücre aracılı, sitotoksik uyarlanabilir bağışıklık için) ve B hücreleri (humoral, antikorla uyarlanmış adaptif bağışıklık için) bulunur. Lenfosit alt grupları Tablo 5’de gösterilmiştir. Periferik bir yaymada T hücreleri ve B hücreleri arasında ayırım yapmak imkansızdır (29). Belirli lenfosit popülasyonu sayımları için akım sitometrisi kullanılır.

T hücreleri (timüs hücreleri) ve B hücreleri (kemik iliği hücreler), adaptif immün tepkisinin başlıca hücresel bileşenleridir. T hücreleri, hücre aracılı immünitede yer alırken, B hücreleri birincil olarak humoral immüniteden sorumludur (antikorlarla ilgili). T hücreleri ve B hücrelerinin işlevi, antijen sunumu olarak bilinen bir süreç sırasında, spesifik "non-self" antijenleri tanımadır. Bir istilacı tespit ettiklerinde hücreler, spesifik patojenleri veya patojenle enfekte olmuş hücreleri maksimal olarak ortadan kaldırmak için uyarlanmış spesifik tepkileri üretir. B hücreleri, daha sonra bakteriler ve virüsler gibi yabancı maddeleri nötralize eden çok miktarda antikor üreterek patojenlere tepki verir. Patojenlere yanıt olarak, T yardımcı hücreleri olarak adlandırılan bazı T hücreleri, immün cevabı yönlendiren sitokinler üretirken, sitotoksik T hücreleri olarak adlandırılan diğer T hücreleri, patojenle enfekte olmuş hücrelerin ölümünü indükleyen güçlü enzimler içeren zehirli granüller üretir.

**Tablo 5: Lenfosit grupları ve özellikleri**

Sınıf	Fonksiyon	Oran	Fenotipik işaretleyici
<b>NK</b>	Viral enfeksiyonlu hücrelerin ve tümör hücrelerinin lizisi	% 7 (%2-13)	CD16 ve CD56, CD3 olmaksızın
<b>T helper</b>	Diğer bağışıklık hücrelerini düzenleyen sitokinleri ve büyüme faktörlerini serbest bırakmak	% 46 (%28-59)	TCR $\alpha\beta$ , CD3 ve CD4
<b>Cytotoxic T</b>	Viral enfeksiyonlu hücrelerin, tümör hücrelerinin ve allogreftlerin lizisi	% 19 (%13-32)	TCR $\alpha\beta$ , CD3 ve CD8
<b>Gamma delta T cells</b>	İmmünoregülasyon ve sitotoksosite	% 5 (%2-8)	TCR $\gamma\delta$ ve CD3
<b>B cells</b>	Antikorların sekresyonu	% 23 (%18-47)	MHC sınıf II, CD19 ve CD20

NK hücreleri, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçasıdır ve konakçıyı hem tümörler hem de viral olarak enfekte olmuş hücrelerden korumak için önemli bir rol oynar. NK hücreleri, MHC (majör histokompatibilite kompleksi) sınıf I olarak adlandırılan bir yüzey molekülünün değişikliklerini tanıyarak normal ve enfekte olmamış hücrelerden enfekte olmuş hücreleri ve tümörleri ayırt eder. NK hücreleri, interferonlara cevap olarak aktive olur. Aktive edilmiş NK hücreleri, daha sonra değiştirilmiş hücreleri yok eden sitotoksik granülleri açığa çıkarır (30). MHC sınıf I eksik olan hücreleri öldürmek için önceden aktivasyon gerektirmedikleri için "doğal öldürücü hücreler" olarak adlandırılırlar.

BAL örneklerinde, karşılaşılan lenfositlerin çoğu sitotoksik T lenfositlerdir, yardımcı T hücreleri ve sitotoksik T hücreleri 1:8'lik bir orana sahiptir. Bu oran, sarkoidozdaki yardımcı T (CD4 pozitif) hücreler lehine veya hipersensitivite pnömonisinde supresör T (CD 8 pozitif) hücrelere doğru değişmektedir (31). Granülomatöz ve viral enfeksiyonlar, hipersensitivite ve ilaca bağlı pnömoni artmış lenfosit sayısı ile ilişkilidir.

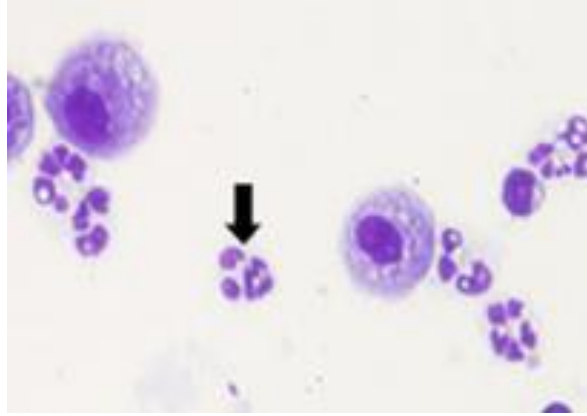
Akciğerlerde, lenfositler sekonder ve tersiyer lenfoid dokularda bölümlere ayrılır. Organize lenfoid dokunun büyük çoğunluğu, ikincil lenfoid farklılaşması için özel bir alan olarak kabul edilen bronş ilişkili lenfoid doku (BALT) ile temsil edilir.

Bununla birlikte, akciğer parankimi normal olarak sadece birkaç lenfoid element içeren bir paradigmatik tersiyer lenfoid dokuyu temsil eder. Aslında, normal sigara içmeyen yetişkinlerde, alveolar boşluk içindeki hücrelerin %90'ından fazlası makrofajlar iken, lenfositler tüm BAL hücre popülasyonununun %5-10'unu oluşturur. Diğer üçüncül lenfosit dokularında olduğu gibi, akciğer lenfositleri epitelyal hücreler ve interstisum arasındaki submukoza ve lamina propria boyunca seyrek olarak dağılmış CD45RO+ “hafıza” hücreleridir.

### 2.4.3. Nötrofiller

Bütün lökositlerin yaklaşık %50-70'ini oluştururlar. Diğer hücrelerin giremediği doku parçalarına girebildikleri için kısa ömürlü (5-90 saat arasında) ve oldukça hareketlidirler. Nötrofiller, segmentli nötrofillere ve bantlı nötrofillere (veya bantlara) bölünebilirler. Bazofiller ve eozinofillerle birlikte polimorfonükleer hücre ailesinin (PMN'ler) bir parçasını oluştururlar (32).

Hematoksin ve eozin (H & E) boyaması ile nötr pembe olarak boyanır ve çapları 12-15 µm olup, ince kromatin iplikleri ile bağlanan 2-5 loba bölünmüş bir çekirdek içerirler (Şekil 4). Eozinofiller ve bazofiller ile birlikte, nükleusun “multilobüler şekilli” (lenfositler ve monositler, diğer beyaz hücreler ile karşılaştırıldığında) olarak adlandırılan polimorfonükleer hücreler sınıfını oluştururlar. Nükleolus nötrofil olgunlaştıkça kaybolur. Sitoplazmada golgi cisimciği küçüktür, mitokondri ve ribozomlar seyrekdir ve kaba endoplazmik retikulum yoktur. Sitoplazma ayrıca üçte biri azurofilik olan yaklaşık 200 granül içerir. Nötrofiller olgunlaştıkça segmentasyonu artar. Normal bir nötrofil 3-5 segmente sahip olur.



**Şekil 4: BAL sıvısında nötrofiller**

Nötrofiller normalde kan dolaşımında bulunurlar. İnflamasyonun başlangıç (akut) fazı sırasında, özellikle bakteriyel enfeksiyonun, çevresel maruziyetin ve bazı kanserlerin bir sonucu olarak inflamasyonun olduğu bölgeye doğru göç eden ilk hücrelerdendir. Kemotaksis denilen bu süreçte, interleukin-8 (IL-8), C5a, fMLP, Lökotrien B4 ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi kimyasal sinyalleri izleyerek, kan damarları boyunca, daha sonra interstisyel doku yoluyla göç ederler (33).

Nötrofiller bağışıklık sisteminin diğer hücrelerinin migrasyonunu sağlama ve aktive etmenin yanı sıra patojenlere karşı ön savunmada anahtar bir rol oynar. Nötrofiller, mikroorganizmalara doğrudan saldırmak için üç yönteme sahiptir. Bunlar fagositoz (yutma), degranülasyon (çözünebilir anti-mikrobiyallerin salımı) ve nötrofil hücre dışı tuzakların (NET) oluşumudur (34).

Nötrofiller degranülasyon adı verilen bir işlemle üç çeşit granülden bazı proteinleri serbest bırakırlar, bu granüller Tablo 6'da gösterilmiştir. Bu granüllerin içeriği antimikrobiyal özelliklere sahiptir ve enfeksiyonla mücadeleye yardımcı olur.

NET, hücre dışı mikropları yakalayan ve öldüren kromatin ve serin proteazlardan oluşan bir lif ağı içerir. Antimikrobiyal özelliklerine ek olarak, NET'ler patojenlerin daha fazla yayılmasını önleyen fiziksel bir bariyer görevi görmektedirler.

**Tablo 6: Nötrofil granülleri ve serbest bıraktıkları proeinler**

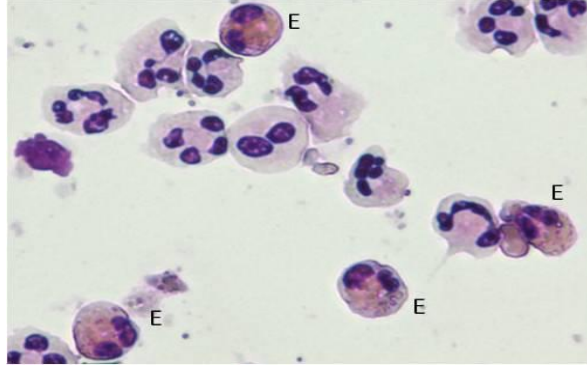
Granül Tipi	Protein
Azurofilik granüller	Miyeloperoksidaz, bakterisidal / geçirgenlik artırıcı protein (BPI), defensinler ve serin proteazlar nötrofil elastaz ve katepsin G
Spesifik granüller	Alkalen fosfataz, lizozim, NADPH oksidaz, kollajenaz, laktoferrin, histaminaz ve katelisin
Tersiyer granüller	Katepsin, jelatinaz ve kollajenaz

Tanımlanmış beş nötrofil antijen (human neutrophil alloantigens: HNA 1-5) kümesi vardır (35). HNA-1 antijeni (a-c), düşük afiniteli Fc- $\gamma$  reseptör IIIb (FCGR3B: CD16b) üzerinde yer alır. HNA-2a antijeni CD177 üzerinde bulunur. HNA-3 antijen sistemi, CLT2 geninin (SLC44A2) yedinci ekzonunda bulunan iki antijene (3a ve 3b) sahiptir. HNA-4 ve HNA-5 antijen sistemlerinin her biri bilinen iki antijene (a ve b) sahiptir ve  $\beta$ 2 integrinde bulunur. HNA-4,  $\alpha$ M zinciri (CD11b) üzerinde bulunur ve HNA-5,  $\alpha$ L integrin birimi (CD11a) üzerinde bulunur.

Nötrofillerin yüzeyinden salınan bazı antijenler Tablo 7’de belirtilmiştir. Bu antijenler flow sitometride nötrofillerin tanımlanması için kullanılabilir.

#### 2.4.4. Eozinofiller

Normal bireylerde eozinofiller, beyaz kan hücrelerinin yaklaşık %1-3’ünü oluşturur. İki loblu bir çekirdek içerir ve yaklaşık 12-17  $\mu$ m büyüklüğündedir (Şekil 5). Bu hücreler, asitlere karşı afinitelerini gösteren çok sayıda ve büyük asidofilik sitoplazmik granüller içerirler. Normalde saydam olan eozinofiller, Romanesky yöntemini kullanarak eosin ile boyandıktan sonra tuğla kırmızısı renge görünürler (36). Eozinofiller 8–12 saat boyunca dolaşımda kalmaktadır ve stimülasyon olmadığında 8-12 gün boyunca dokuda hayatta kalabilirler (37). Eozinofil peroksidaz, ribonükleaz (RNaz), deoksiribonükleazlar (DNaz), lipaz, plazminojen ve majör bazik protein gibi birçok kimyasal aracı içeren granüller hücresel sitoplazma içinde konsantre edilir. Bu araçlar eozinofilin aktivasyonunu takiben degranülasyon adı verilen bir işlemle serbest bırakılır ve hem parazit hem de konakçı dokular için toksiktir.



**Şekil 5: BAL sıvısında eozinofiller (E)**

Eozinofiller, medullada ve timüs ile korteks arasındaki bağlantıda ve alt gastrointestinal kanalda over, uterus, dalak ve lenf düğümlerinde bulunurlar, fakat normal koşullarda akciğer, deri, özofagus veya diğer bazı organlarda bulunmazlar. Akciğer, deri ve özofagusda bulunmaları hastalık ile ilişkilidir. Mast hücreleri ve bazofiller ile birlikte alerji ve astım ile ilişkili mekanizmaları kontrol ederler.

Aktive olan eozinofil tarafından katyonik granül proteinlerinin üretimi ve degranülasyon yoluyla salınımı; reaktif oksijen radikallarının (hipobromit, süperoksit ve peroksit gibi) oluşturulması; lökotrien (örn., LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) ve prostaglandin (örn., PGE<sub>2</sub>) ailelerinden olan eikosanoidlerin üretimi; elastaz gibi enzimlerin üretimi; TGF beta, VEGF ve PDGF gibi büyüme faktörlerinin üretimi; interlökinler ve TNF alfa gibi sitokinlerin üretimi gerçekleştirilir (38).

Eozinofiller, bazofiller ve mast hücreleri ile birlikte, alerjik yanıtların ve astım patogenezinin önemli araçlarıdır ve hastalık şiddeti ile ilişkilidir. Aynı zamanda helmint kolonizasyonu ile savaşır ve bazı parazitlerin varlığında hafifçe yükselebilirler. Eozinofiller ayrıca postpubertal meme bezi gelişimi, östrojen döngüsü, allogreft reddi ve neoplazi dahil olmak üzere diğer birçok biyolojik süreçlerde rol oynarlar. Bir immün uyarının aktivasyonunu takiben, eozinofiller, doku hasarı ve fonksiyon bozukluğunu indükleyebilen major basic protein (MBP), eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil peroxidase (EPX), eosinophil-derived neurotoxin (EDN) içeren bir dizi sitotoksik granül katyonik proteini serbest bırakmak üzere degranüle eder (39). MBP, ECP ve EPX birçok doku için toksiktir. ECP ve EDN, antiviral aktiviteye sahip ribonükleazlardır.



Eozinofillerin yüzeyinden salınan bazı antijenler Tablo 7’de belirtilmiştir. Bu antijenler akım sitometride eozinofillerin tanımlanması için kullanılabilir.

**Tablo 7: Granülosit (Nötrofil ve Eozinofil) İşaretleyicileri**

Nötrofiller			Eozinofiller	
CD10	CD66c	CD157	CD9	CD123
CD15	CD66d	CD177	CD15	CD125
CD17	CD89	CD181	CD24	CD126
CD24	CD93	(CXCR1)	CD35	CD193 (CCR3)
CD35	CD112	CD282	CD43	CD244
CD43	CD114	(TLR2)	CD64	FcεR1
CD66a	CD116	CD284	CD116	
CD66b		(TLR4)		
		CD286		
		(TLR6)		
		Calprotectin (S100A8/A9)		

## 2.5. Bal Sıvısı Hüresel Bulgularının İnterstisyel Akciğer Hastalıklarda Klinik Kullanımı

### 2.5.1. İdiopatik Pulmoner Fibrozis (İPF)

İPF, erişkinlerde kendini gösteren ve olağan interstisyel pnömoni (OİP) paterni, cerrahi akciğer biyopsisi ve/veya YÇBT taraması ile karakterize edilen bir klinik antidedir. BAL hücre profili tek başına İPF'nin tanısını koymakta yetersizdir. İPF'deki tipik BAL hüresel profilinde ağırlıklı olarak makrofajlarla birlikte orta derecede artmış nötrofil ve eozinofil oranları ve genellikle normal lenfosit oranları mevcuttur. %5'ten büyük ve hatta bazen %30 a varan nötrofil oranları hastaların %90'ında görülür. Nötrofil sayıları YÇBT'de görülen hastalığın derecesi ile doğru orantılı olabilir. %5'in üzerinde eozinofil oranları hastaların yaklaşık %60'ına görülür. Atipik BAL sıvısı hüresel profillerinde eozinofil sayıları %20'den fazla veya lenfosit sayıları %15'ten büyüktür. Bunlar gibi atipik bulgular olduğunda eozinofilik akciğer hastalığı, nonspesifik interstisyel pnömoni (NSİP), kriptojenik organize pnömoni (KOP),

enfeksiyon, hipersensitivite pnömonisi (HP) ve sarkoidoz gibi ayırıcı tanılar düşünölmelidir (40).

BAL nötrofillerinde veya eozinofillerdeki artışlar azalmış sağkalım ile ilişkili iken, tüm çalışmalar bunu doğrulamamıştır (41). Artmış lenfosit sayısının varlığı, kortikosteroid tedavisine daha yüksek yanıt verme ve daha iyi bir sağkalım ile ilişkili bulunmuştur; bununla birlikte, bu çalışmaların çoğu, İPF tanısı koyulmadan önce NSİP'in dışlanması ile gerçekleştirilmiştir. Daha güncel olan bir çalışmada başlangıçtaki artmış BAL nötrofil yüzdesinin erken mortalitenin bağımsız bir belirleyicisi olduğunu, buna karşın lenfosit ve eozinofil yüzdelерinin olmadığını göstermiştir (42).

### **2.5.2. Nonspesifik interstisyel pnömoni (NSİP)**

NSİP, İPF'ye kıyasla nispeten daha iyi prognoza sahip bir idiyopatik interstisyel pnömoni (İİP) olarak kabul edilmektedir. Histopatolojisi değişkendir (hücresel, karma veya fibrotik) ve klinik prezentasyon subakuttan kronik biçimlere kadar uzanır. NSİP'deki fibrotik değişiklikler geçici olarak homojendir (43) ve cerrahi akciğer biyopsisinden elde edilen örneklerde yoğun fibrozisli fibroblastik odaklar belirgin şekilde bulunmaz.

Hücresel NSİP'li hastalarda BAL sıvısı hücre profili tipik olarak azalmış bir CD4/CD8 oranı ile artmış bir lenfosit oranına sahiptir (44). Diğer bulgular olmadığında bu özelliklerin sınırlı tanısal değeri vardır, çünkü kolajen vasküler hastalıklar, hipersensitivite pnömonisi, ilaca bağlı reaksiyon ve malignite gibi çeşitli hastalık süreçlerinde de benzer BAL bulguları mevcuttur. Bununla birlikte, BAL sıvısı hücresel analizi NSİP ile uyumlu klinik-radyolojik özellikler ile birlikte değerlendirildiğinde NSİP tanısını kuvvetle önerebilir. YÇBT üzerindeki diffüz buzlu cam opasiteleri ile BAL lenfositözünün birlikte bulunması, hücresel NSİP teşhisini desteklemektedir, ancak HP, KOP, ilaç toksisitesi veya sarkoidoz gibi diğer antiteler de BAL sıvısında lenfositöz ile ilişkilidir.

### 2.5.3. Kriptojenik Organize Pnömoni (KOP)

Önceleri idiyopatik bronşiolitis obliterans organize pnömoni (BOOP) olarak adlandırılan hastalık, inhalasyon yaralanmaları, radyasyon, bağ dokusu hastalıkları, transplant reddi, çeşitli ilaçlar ve viral pnömoniler ile ortaya çıkan organize pnömonilerden farklıdır. Radyolojisi ve klinik seyri birçok pulmoner hastalığa benzediğinden, tanısal bronkoskopi genellikle fungal, mikobakteriyel ve malign hastalıkları dışlamak için BAL ve biyopsi kullanılarak gerçekleştirilir. KOP'deki BAL hücre profili, değişken derecelerde lenfositler, nötrofiller, eozinofiller, plazma hücreleri, mast hücreleri ve köpüklü makrofajlardan oluşur. Hastalığın kronikliği ile ilgili bazı tahminler BAL'ın KOP ile uyumlu olup olmadığını tanımlamaya yardımcı olur. Lenfositler tipik olarak kronik vakalarda baskındır. Fulminan KOP tipik olarak daha yüksek oranda BAL nötrofillerine sahiptir (45). Eozinofil oranları genellikle %2 ile %25 arasındadır. Daha yüksek yüzdelerde olursa eozinofilik pnömoni düşünülmelidir.

KOP, diğer interstisyel akciğer hastalıkları ile karşılaştırıldığında BAL sıvısında lenfosit sayısının artmasına neden olmuştur (46). HP ve sarkoidoz artmış bir lenfosit yüzdesine sahip olmasına rağmen, klinik prezentasyon ve YÇBT genellikle KOP'dan farklıdır ve sarkoidozda BAL eozinofillerinde bir artış genellikle yoktur.

### 2.5.4. Eozinofilik interstisyel akciğer aastalıkları (EAH)

Eozinofilik akciğer hastalıkları (EAH), belirgin eozinofil birikimleriyle tanımlanan heterojen bozukluklara sahip bir gruptur. Bunlar arasında ilaca bağlı pulmoner eozinofili, akut veya kronik eozinofilik pnömoni, parazitik enfeksiyonlar, hipereozinofilik sendrom, eozinofilik granülomatozis polianjitis (EGPA; Churg-Strauss sendromu) ve alerjik bronkopulmoner aspergilloz (ABPA) bulunur. Ek olarak, malignite, pulmoner Langerhans hücreli histiyositoz (PLCH), diğer sistemik vaskülitler veya sarkoidozda da belirgin eozinofil infiltrasyonu görülebilir.

BAL eozinofilisinin tanısal değeri özellikle kan eozinofil seviyesi normal ise yararlı olabilir. Pulmoner eozinofili tanısı, BAL sıvısının hücresel diferansiyel sayımında %25 veya daha fazla eozinofil göstermesi halinde konulabilir (47). BAL

sıvısındaki artmış olan eozinofil, kronik granüloamatöz hastalıklar (örn. tüberküloz veya sarkoidoz), mantar hastalıkları (örn. Koksidiyodomikoz veya aspergillozis), hipersensitivite pnömonisi (HP), ilaç ve kimyasalla ilgili durumlar, idiopatik pulmoner fibrozis (İPF), kollajen vasküler hastalıkların akciğer tutulumu ve P. carinii pnömonisi gibi çeşitli inflamatuvar hastalıklarda görülebilir. Bununla birlikte, bu koşullar nadiren %10'dan fazla eozinofil içerir. Daha yüksek oranda eozinofili olan hastalar büyük olasılıkla EAH'a sahiptir.

Akut eozinofilik pnömoni (AEP), yaşamı tehdit eden solunum yetmezliği ile sonuçlanabilen akut ateşli bir hastalıktır ve BAL'da eozinofillerin varlığı genellikle dikkat çekicidir. Akut eozinofili tanısı, hasta zaten kritik derecede hastaysa bile çoğu zaman klinik bulgularla birlikte BAL sıvısının (BAL sıvısı diferansiyel hücre sayımında  $\geq$ 25 eozinofil) incelenmesi ile hızlı ve güvenli bir şekilde yapılabilir. Ayrıca, diffüz alveoler hasar (Diffuse Alveolar Damage: DAD) ile BAL sıvısında eozinofilinin varlığı AEP şüphesini güçlendirebilir (48). Kortikosteroidler ile tedavi, relaps olmadan hızlı tam iyileşme sağlar. Kronik eozinofilik pnömoni (KEP), kadınlarda baskın olarak ortaya çıkan bilinmeyen bir etiyolojiye sahip bir hastalıktır (47). BAL sıvısındaki eozinofil yüzdesinin artması ve kortikosteroidlere hızlı bir şekilde yanıt vermesinden oluşan tipik bir klinik durum ile çoğu vakada KEP tanısı konulabilir ve akciğer biyopsisi ihtiyacını ortadan kaldırır. Kronik eozinofilik pnömoninin (KEP) klinik görünümü, İPF'yi taklit edebilir, ancak KEP'nin daha iyi bir prognozu vardır.

Akciğer grafisi veya YÇBT'de periferik radyografik opasiteler veya konsolidasyon ile kombine edilen BAL diferansiyel yüzdesindeki eozinofil sayısında ( $\geq$ 25%) büyük bir artışın bulunması, AEP/KEP veya ilaca bağlı EAH tanısını güçlü bir şekilde desteklemektedir.

### **2.5.5. İnterstisyel akciğer hastalığı olan deskuamatif interstisyel pnömoni ve respiratuvar bronşiyolit**

Respiratuvar bronşiyolit (RB), respiratuvar bronşiyolit ile ilişkili interstisyel akciğer hastalığı (RB-İAH) ve deskuamatif interstisyel pnömoni (DİP) örtüşen özelliklere sahiptir ve hepsi sigarayla yüksek oranda ilişkilidir. RB-İAH, respiratuvar bronşiyoller

ile komşu alveollere pigmentli makrofajların birikmesi, hafif alveolar septal kalınlaşma ve fibrozis üzerine odaklanan hafif inflamatuvar değişikliklerle karakterizedir (49). RB-İAH tanısı klinik özelliklere (semptomlar, klinik belirtiler, solunum fonksiyon değişiklikleri ve radyolojik, tercihen YÇBT, anormallikler) dayanmaktadır. DİP'nin histolojik özellikleri RB-İAH'a benzerdir.

BAL, DİP veya RB-İAH da tanısız değildir, ancak BAL hücrel analizi ayırıcı tanıda yardımcı olabilir. Literatürde RB-İAH ve DİP için nispeten az sayıda BAL verisi vardır, bu da muhtemelen bu hastalıkların nadir görülmesi ile ilişkilidir. Normal sigara içen kişilerden ayırt edilemeyen kahverengi veya siyah pigmentli inklüzyonlar içeren alveolar makrofajlarda bir artış RB-İAH'da da vardır. Nötrofillerde hafif bir artış da gözlenebilir. BAL hücrel profili tipik olarak, DİP'de pigmentli makrofajlarda bir artış gösterir, ancak nötrofiller, eozinofiller ve lenfositlerde artışlar da görülebilir. Kahverengi pigmentli makrofajlarda kayda değer bir artışla birlikte, eozinofiller ya da lenfositlerde artış olmadan ılımlı bir nötrofil artışı ile karakterize BAL bulguları RB-İAH tanısını öngörebilir (50).

### **2.5.6. Akut interstisyel pnömoni**

Akut interstisyel pnömoni (AİP) ilk olarak 1935'te Hamman ve Rich tarafından tanımlanmıştır (51) ve hızla ilerleyen, fibrotik pnömonit vakalarının çoğunluğuna karşılık gelmektedir. Hamman ve Rich ilk raporlarında İAH ve pulmoner fibrozise dikkat çektiler ve "Hamman-Rich sendromu" hiçbir nedenin belirlenemediği ilerleyici pulmoner fibrozisi tanımlamak için kullanıldı. Hamman-Rich sendromu sonunda diffüz alveolar hasarın (DAD) histopatolojik bulgularına bağlanmıştır ve klinik tanımlayıcı adı olarak AİP belirlenmiştir. AİP'in başlıca özellikleri arasında semptomların hızlı başlangıcı, tanımlanabilir bir neden bulunmaması ve akciğer dokusunun incelenmesinde diffüz alveolar hasarın varlığı sayılabilir.

BAL sıvısı hücrel bulguları, AİP'in doğal seyri nedeniyle lavajın gerçekleştirildiği zamana göre değişebilir, ancak genellikle hemoraji (RBC ve/veya hemosiderin varlığı) ile birlikte görülebilen tüm hücreler ve nötrofillerdeki bir artışa sahiptir (52). Bununla birlikte, literatürde bir olgu serisinden veya vaka raporlarından başka daha büyük bir kohorttan az veri bulunmaktadır. AİP'de BAL hücrel bulguları

spesifik olmamasına rağmen, hücresel modeli destekleyici veriler sağlayabilir ve akut EP, akut HP, enfeksiyon veya DAH gibi diğer tanıları tanımlayarak veya hariç tutarak ayırıcı tanıda yardımcı olabilir. Bununla birlikte, BAL kesin bir tanı sağlamadığı ve klinik görünümün ARDS tanısı ile uyuşmadığı durumlarda cerrahi akciğer biyopsisinin yapılması gerekmektedir.

### **2.5.7. Lenfoid interstisyel pnömoni (LİP)**

Lenfoid interstisyel pnömoni (LİP) birçok uzman tarafından pulmoner lenfoproliferatif bir bozukluk ve muhtemelen bir preneoplastik lezyon olarak tanımlanır. Bununla birlikte, immünohistokimyasal yöntemlerin gelişmesi, LİP'in mukoza ile ilişkili lenfoid doku (MALT, düşük dereceli B hücreli lenfomalardandır) lezyonları dahil olmak üzere gerçekten neoplastik lezyonlardan ayrılmasını sağlamıştır ve malign transformasyonun LİP'de olağandışı olduğunu göstermiştir (53). Amerikan Toraks Derneği, LİP'in esas olarak interstisyel değişikliklerle birlikte yaygın pulmoner lenfoid hiperplazinin histolojik bir varyantı olarak kabul edilmesi gerektiğini, bunun da germinal merkezlere sahip peribronşiyolar lenfositik infiltratları olan foliküler bronşiyolit ile ilişkili olduğunu belirtmektedir (54).

LİP'nin nadir görülmesi nedeniyle BAL sıvısı hücresel profili ile ilgili nispeten az bilgi bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda LİP'li hastalardan BAL sıvısında hem toplam lenfositlerde hem de lenfositlerin farklı alt tiplerinde anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir (55). BAL lenfositlerinin immünglobulin gen ekspresyonunun incelenmesi tanıda yardımcı olabilir.

### **2.5.8. Sarkoidoz**

Sarkoidoz, etyolojisi tam olarak bilinmeyen, birçok organda epitelooid hücre granülomlarının varlığı ile histopatolojik olarak tanımlanan multisistemik bir hastalıktır. Bu granülomlar, etrafını çevreleyen lenfositler ile karakterizedir. Bronkoalveolar lavajda, ağırlıklı olarak aktive edilmiş Th-1 fenotipi olduğu gösterilmiş olan havayolu lenfositleri görülür. Fenotipik olarak, bu hücreler CD4, HLA-DR ve diğer aktivasyon belirteçlerinin ifadesi ile karakterize edilir. Artmış olan

CD4/CD8 oranı 1991'de sarkoidoz tanımına dahil edilmiştir, buna karşılık 1999'daki ATS/ERS bildirisinde, CD4/CD8 oranı tanımı "yüksek Th-1 immün cevabı" ile değiştirilmiştir (56).

Sarkoidozda, BAL sıvısı tanı anında hastaların %90'ında artmış lenfosit içerir. BAL sıvısındaki toplam hücre sayısı genellikle, hipersensitivite pnömonisinde belirgin yükselmenin aksine, pulmoner sarkoidozda hafifçe yükselir. Klinik olarak aktif hastalıkta lenfositlerin nispi oranı daha yüksektir (%20-80, ortalama %40), ancak klinik olarak inaktif sarkoidozlu hastalar daha düşük bir yüzdeye sahiptir (ortalama %30). Aktif ve inaktif hastalık arasında lenfositlerde ciddi bir örtüşme vardır ve BAL sıvısı hücre sayımı hastaların % 10-15'inde normal olabilir (57). Geç veya ilerlemiş sarkoidozda, nötrofillerin yanı sıra mast hücrelerinin sayısı da artabilir (58).

Lenfositlerin baskın olduğu, normal bir eozinofil ve nötrofil yüzdesi olan normal veya sadece hafif yüksek toplam hücre sayısı ve plazma hücrelerinin veya köpüklü alveoler makrofajların yokluğu sarkoidoz için karakteristiktir. BAL CD4/CD8 oranı sarkoidozlu hastaların yaklaşık %50-60'ında artmıştır. Bu oranın sarkoidozdaki tanısal değeri yüksek değişkenlik gösterir, hastaların yaklaşık %15'inde düşüktür. Welker ve arkadaşları, artmış lenfositler ve artmış CD4/CD8 oranı birlikteliğinin (59) sarkoidoz olasılığının iki katına çıkardığını göstermişlerdir.

BAL sıvısında lenfositoz ile birlikte CD4/CD8 oranındaki artışın saptanması, özellikle tutarlı klinik ve radyografik bulgular ile kombine edildiğinde sarkoidoz teşhisini güçlü bir şekilde desteklemektedir.

### **2.5.9. Hipersensitivite pnömonisi**

Ekstrinsik alerjik alveolit olarak da bilinen hipersensitivite pnömonisi (HP), organik tozlar ve düşük molekül ağırlıklı kimyasal bileşikler gibi antijenlerin tekrarlayan inhalasyonundan kaynaklanan immün aracılı bir akciğer hastalığıdır. Hastalık, küçük hava yolları ve pulmoner parankimi etkileyen diffüz lenfositik inflamasyon ile karakterizedir. HP, klinik olarak akut, subakut ve kronik olarak sınıflandırılmıştır. Klinik prezentasyon, antijene maruz kalma miktarı ve süresi, inhale edilen tozun yapısı ve hastanın yanıtı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Sigara içmeyenlerde HP, aynı maruz kalma riskine rağmen, sigara içenlere göre daha sık görülür (60). Sigara ile sağlanan

bariz korunmanın nedenleri bilinmemektedir, ancak sigara içiminin, bağışıklık reaksiyonunu antijene karşı azaltabilecek ve böylece HP'nin gelişmesi için gerekli olan artmış yanıtı önleyebilen lokal immünsüpresif etkisi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (61). HP'deki BAL hücre profili, toplam hücre sayısında, özellikle de %50'yi aşan değerlerde görülen lenfositlerin oranında dikkate değer bir yükselme ile karakterizedir. Belirgin BAL sıvısı lenfositozu bu hastalığın en tutarlı bulgusudur ve birçok klinik çalışmada bildirilmiştir (62). Güvercin yetiştiricisi hastalığında, subakut (tanıdan önce semptomların başlangıcı <3 ay) ve kronik (semptomların başlangıcı > 12 ay) olgularda BAL lenfositleri genellikle %50'nin üzerindedir, ancak subakut olgularda kronik HP'ye göre anlamlı derecede daha yüksektir (63). Genel olarak, %30'un altında görülen BAL lenfosit oranı, şüpheli HP tanısı düşündürür ve BAL lenfositozunun, antijene maruz kalan ancak hastalığı geliştirmeyen asemptomatik bireylerde de bulunabileceğini unutulmamalıdır.

HP'deki BAL CD4+/CD8+ oranı oldukça değişkendir ve muhtemelen klinik formdan (akut veya kronik), tütün dumanına maruz kalmadan, solunan antijenin tipi ve dozundan ve muhtemelen antijen maruziyetinin süresinden etkilenmektedir. CD4+ T hücreleri sıklıkla sigara içenlerde veya hastalığın kronik/fibrotik formları olanlarda bulunurken, CD8+ olanlarda baskın bir artış akut HP'li sigara içmeyenlerde görülmektedir. Ek olarak, artmış natural killer hücreler, major histocompatibility complex (MHC) ile sınırlı sitotoksik lenfositler ve lenfokin ile aktive edilmiş natural killer hücreler genellikle HP hastalarında BAL'da tespit edilir (64).

Farklı interstisyel akciğer hastalıkları olan hastalardan elde edilen 1.260 BAL sıvısının analiz edildiği bir çalışmada, HP ve ilaca bağlı pnömoni olan hastalarda plazma hücreleri daha yüksek oranda bulunmuştur (65). BAL'da plazma hücreleri bulunan HP hastaları için plazma hücreleri son antijen maruziyetinden 2-7 gün sonra yükselir ve daha sonra zamanla giderek azalır ve plazma hücrelerine artan sayıda lenfosit, eozinofil ve mast hücresi eşlik eder; ayrıca BAL sıvısında plazma hücreleri olmayan HP hastalarına kıyasla daha düşük bir CD4+/ CD8+ oranı mevcuttur.

HP'nin akut atakları genellikle dolaşımdaki nötrofillerin sayısındaki artışla birlikte bu hücrelerin akciğere göç etmesi ile ilişkilidir. Hastalara son maruziyetin ardından günler hatta haftalar sonra BAL yapıldığından bu artış görülemez, nötrofillerin erken artışı, sadece antijen maruziyetinden hemen sonra BAL



gerçekleştirilirse ortaya çıkar, BAL sıvısında nötrofiller antijen maruziyetinden bir ay sonra bile kontrol deneklerinden daha yüksek görülmüştür (66).

#### **2.5.10. Bağ dokusu hastalığı (BDH) / kollajen vasküler hastalığa (KVH) bağlı interstisyel akciğer hastalığı**

Romatolojik hastalıkların birçoğunda, farklı hastalarda diffüz akciğer hastalığının farklı şekilleri ortaya çıkabilir ve aynı hastada, hava yolu veya diğer intratorasik hastalıkların bir kombinasyonu, yaygın akciğer hastalığı ile birlikte olabilir ve hastaların akciğerleri rutin değerlendirmenin bir parçası olarak araştırıldığında, akciğer semptomları olmayan bireylerde subklinik hastalık görülebilir. OİP, NSİP, LİP, DAD, KOP ve DİP'in patolojik paternleri, romatolojik hastalığa sahip hastalarda bulunabilir ve diffüz akciğer hastalığının bu patolojik paternleri, bronşiolitis obliterans ve bronşektazi dahil olmak üzere solunum yolu hastalıkları ile birlikte olabilir.

Sistemik skleroz (SSc) için bazı bilgiler mevcut olmasına rağmen BAL hücre profilleri ile akciğer histopatolojisi korelasyonları oldukça sınırlıdır. SSc'de bir dereceye kadar çalışılmış olmasına rağmen, şu anda mevcut YÇBT görüntüleme bağlamında BAL hücre paternlerinin ve BDH ile ilişkili İAH'ın klinik önemi ile ilgili çok az veri bulunmaktadır. Önemli çalışmalarda, “kollajen vasküler hastalığı” olan az sayıda hastada artmış nötrofil, eozinofil ve lenfosit varlığı bildirilmiştir (67). 1992'de yayınlanan bir çalışmada (68) BDH vakaları “İAH” olan ve olmayan alt gruplara ayrılmıştır. Bildirilen baskın anormallik, romatoid artrit (RA), sistemik lupus eritematozus (SLE) ve Sjögren sendromunda nötrofiller yükselirken, SSc'de BAL sıvısında nötrofillerle birlikte eozinofillerin de artmış olduğu bildirilmiştir.

#### **2.5.11. Mesleki interstisyel akciğer hastalığı**

İş yerindeki çevresel maruziyetler, genetik olarak yatkın bir insanda spesifik İAH'a neden olabilir. “Mesleki İAH” tanısı, distal solunum yollarında ve/veya akciğer parankiminde asbest, silika, silikat veya kömür tozunun birikiminden, demir, gümüş, baryum ve nadir toprak metallerine maruz kalmadan kaynaklanan metal kaynaklı granümatöz bozukluklar (berilyum, alüminyum, titanyum ve insan yapımı mineral

lifler tarafından), sert metal hastalığı (hard metal disease: HMD) ve daha seyrek olarak fibrotik değişikliklerden kaynaklanan bir grup kronik akciğer hastalığı olan pnömokonyozları içerir. Kömür işçisi pnömokonyozu (KİP), silikoz ve asbestoz tanısı genellikle ilgili bir maruziyet öyküsüne, uyumlu bir klinik tablonun ve tipik radyolojik anormalliklere dayanır. Kronik berilyum hastalığı (KBH) için tanı kriterleri, berilyum maruziyeti ve in vitro periferik kan veya BAL sıvısı T-hücre proliferasyon testine (Be lenfosit proliferasyon testi, Be-LPT) pozitif bir yanıtı içerir (69). Diğer İAH'larının dışlanması için doku tanısı genellikle gereklidir.

Mesleki İAH tanısında BAL sıvısının tanısız değeri zayıftır. Bugüne kadar yayınlanmış raporlarda önemli sınırlamalar vardır. Bunlar arasında BAL teknik prosedürlerindeki farklılıklar, çalışma koşullarını kategorize etmek için Uluslararası Çalışma Örgütü (ILO) göğüs röntgeni sınıflamasının (HRCT çalışmaları ile korele edildiğinde ILO skorunda düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu gösterilmiştir) kullanımı, dahil etme ve dışlama kriterleri, işe alım ve örnekleme yöntemleri ve mevcut tedavilerin sadece sınırlı sayıda çalışmada rapor edilmesi ve çoğu çalışma bildirilen klinik ve radyolojik veriler açısından BAL sonuçlarının tarafsız yorumunu içermediğinden, yanlılık potansiyelinin yüksek olması vardır.

Mesleki İAH için yapılan çalışmalar incelendiğinde; artan makrofaj sayıları ve yüksek oranda kömür tozu içeren makrofajlar gösteren BAL hücre profilleri, KİP veya progresif masif fibrozisin (PMF) olduğunu düşündürmektedir (70).

Silikaya maruz kalan işçilerin ve silikozisli işçilerin BAL sıvısı hücresel profilleri, makrofajlarda artış ve makrofajların silika partikül yükü ile karakterizedir, ayrıca lenfosit ve nötrofilin artması, silikozis progresyonu ile ilişkili bulunmuştur (71).

Sigara içmeyen asbeste maruz kalan bireylerde ve asbestozisli hastaların BAL sıvısı hücresel profilleri, tüm hücre tiplerinde bir artışla karakterizedir (72). BAL'daki asbest body (AB)/lif sayısı, maruziyet ve hastalık arasında ayırım yapmaz.

Kronik berilyum hastalığında (KBH) BAL sıvısında lenfositöz mevcuttur. İmmünohistolojik BAL profili, bir KBH teşhisine destek sağlar ve biyopsi yapılmayan veya transbronşiyal biyopside (TBB) granülomlar elde edilemeyen olgularda kesin tanı elde edilmesine yardımcı olabilir. Kan Be-LPT testi negatif olduğunda bile BAL Be-LPT pozitif olabilir. Pozitif bir BAL Be-LPT KBH için kan Be-LPT yerine belirleyici kriterlerden biri olarak kullanılabilir (69).

Ağır metal hastalığında dev hücreler hastalığının ayırt edici özelliklerini temsil etseler de, mevcut kanıtlar tanı için BAL sıvısında dev hücrelerin saptanmasının tanısal olmadığını düşündürmektedir (73).

#### **2.5.12. Spesifik interstisyel akciğer hastalıkları (İİP Olmayan)**

- **Pulmoner Langerhans Hücreli Histiositoz (PLCH):**

Langerhans hücreli histiositoz (LCH) monosit-makrofaj hücre kökeni içeren nadir kronik granüloamatöz bir hastalıktır. LCH'nin klinik özellikleri izole bir kemik lezyonundan çoklu organ tutulumuna kadar değişir (74). Lokalize hastalık daha önce eozinofilik granüloma olarak adlandırılmış ve multisistem formları sıklıkla Hand-Schüller-Christian hastalığı, histioz X ve Letterer-Siwe hastalığı gibi isimler ile ifade edilmiştir, ancak terminoloji artık LCH'ye basitleştirilmiştir. Pulmoner LCH'nin (PLCH) klinik özellikleri değişkendir. Hastaların çoğu spesifik olmayan solunum semptomları olan sigara içicileridir ve tekrarlayan pnömotoraks karakteristik belirtilerden biridir. S-100 proteini, CD1a ve HLA-DR için boyamalar içeren (75) immunohistokimyasal çalışmalar Langerhans hücrelerinin (LC) tanınmasında yararlıdır. LC'ler çeşitli patolojik pulmoner süreçlerde tanımlanabildiği için, Langerhans hücreleri PLCH için tanısal değildir. Erişkinlerde pulmoner LCH'nin histolojik tanısı, tipik akciğer lezyonlarının tanımlanmasına dayanmakta ve artmış sayıda LC'nin güvenilir bir şekilde gösterilmesi ile birlikte değerlendirilmektedir (74).

LCH'nin esas histopatolojik özelliği, antijen sunan hücreler olarak işlev gören monosit-makrofaj kökeninden farklılaşmış hücreler olan LC'lerin anormal proliferasyonudur. LC'lerin kesin olarak tanımlanması için iki morfolojik özellik vardı ve bunlar; histiositik kökenli diğer hücrelerde gözlenmeyen pentalaminar, elektron mikroskobu üzerinde tenis raketi şeklindeki hücre içi yapılar ve CD1a antijeninin güçlü varlığı gibi görünen Birbeck granüllerinin varlığıdır (76). Langerhans hücreleri; epidermis, lenf nodlarını birbirine bağlayan hücreler, timüs, gastro-intestinal sistem, serviks ve akciğerin mukozasını içeren normal dokularda yaygın olarak dağılırlar. Sigara dumanı, asemptomatik sigara içenlerde olduğu gibi PLCH hastalarının akciğerlerindeki LC'lerde artışa neden olur (77).

LCH'nin tanısı, Langerhans hücrelerinin tipik morfolojik özellikleri, ışık mikroskobu ile görüldüğünde ve ek boyamalar (örn., Protein S-100) pozitif olduğunda tanısal olarak “olası” olarak tanımlanır; buna karşın CD1a antijeni için boyamalar pozitif ve/veya intrasitoplazmik organeller (Birbeck granülleri) elektron mikroskobu ile görülürse tanısal olarak “kesin” olarak tanımlanır.

Pulmoner LCH, BAL'ın yüksek tanısal değere sahip olduğu ve akciğer biyopsisinin yerini alabileceği birkaç hastalıktan biridir. BAL hücre incelemesi sıklıkla nötrofillerin ve eozinofillerin ılımlı yükselmesi ile birlikte toplam hücre ve makrofaj sayısının artmasını gösterir (78). BAL sıvısında LC'nin gösterilmesi uygun bir klinikopatolojik ortamda tanıyı destekler. Bununla birlikte, düşük sayıda LC, PLCH'yi dışlayamaz çünkü lezyonlar düzensizdir ve LC sayısı, aşamaya bağlıdır ve hastalık ilerledikçe azalır.

- **Pulmoner Alveolar Proteinozis:**

Pulmoner alveolar proteinozis (PAP), alveollerin fosfolipid açısından zengin proteinli materyal ile dolduğu nadir bir hastalıktır. Olguların %90'ından fazlasında etyoloji bilinmemektedir. Konjenital PAP, otozomal resesif bir şekilde (79) aktarılan ayrı bir genetik bozukluktur. Sekonder PAP; akciğer enfeksiyonları, hematolojik maligniteler ve hastanın bağışıklık durumunu değiştiren durumlar ve silika gibi alüminyum tozu, böcek ilaçları ve titanyum gibi inhale edilen kimyasallara veya minerallere maruz kalma ile ilişkilidir. Hastaların çoğu erkektir (erkek: kadın oranı 2.65 : 1.0) ve sigara içicidir (80). PAP genellikle yavaş yavaş artan dispne, minimal prodüktif öksürük veya minimal kilo kaybı ve düşük dereceli ateşle ilişkili olarak ortaya çıkan yorgunluk ile kendini gösterir. Akciğer grafisi bulguları, sol kalp yetmezliğinin diğer radyografik bulguları olmadan “kelebek” veya “yarasa kanadı” görünümünde pulmoner ödem düşündürmektedir. YÇBT taramasında, genellikle çok köşeli şekillerdeki interlobüler septal kalınlaşmalarıyla birlikte yamalı ya da coğrafi dağılımlı “buzlu cam” opasiteleri ya da konsolidasyon görünümü mevcuttur ve bu PAP için karakteristik olan “crazy-paving” görünümü olarak adlandırılır (81). PAP, BAL'ın yüksek tanı verimine sahip olduğu hastalıklardan biridir ve çoğu durumda cerrahi akciğer biyopsisinin gereksiz hale geldiği bir hastalıktır. Ek olarak, akciğer lavajı tedavide önemli bir değere sahiptir.

PAP hastalığında BAL uygulandığında, alınan sıvı çok bulanık veya süt gibidir ve bekletildiğinde oldukça hızlı bir şekilde yerleşmiş yoğun, beyaz topak topak tiftikli görünümde bir materyal içerir. BAL çökeltisi, biyopsi örneklerinde görülen intra-alveolar materyalin aynısıdır, bol lamellar cisimler ve hücrel debrisler mevcuttur (82). Lavaj sıvısının ana bileşeni, yüzey aktif maddenin önemli bir fosfolipit bileşeni olan lesitindir, ayrıca, BAL sıvısı ve serumunda, surfaktan protein A (SP-A) ve surfaktan protein D (SP-D) konsantrasyonunda artış (10-50 kat) mevcuttur (83). Bu bulgular birikmiş alveolar materyalin surfaktan türevi olduğunu göstermektedir. Hücreler BAL sıvısında nadiren seyreltilir ve lavaj sıvısının diferansiyel hücre sayısı genellikle tanıya yardımcı olmaz.

PAP'li hastalardan alınan BAL sıvısı tipik olarak bulanık veya süt görünümündedir ve hızla yerçekimi ile yerleşen yoğun, beyaz topak topak tiftikli görünümde bir materyal içerir. Bu amorf materyal, özellikle de globüler yapıları, PAS boyaması ile pozitif, fakat Alcian Blue ile negatif olarak boyanır ve sitospinler genellikle nispeten az sayıda enflamatuar hücre gösterir. Tipik YÇBT bulguları ve klinik prezentasyon ile kombinasyon halinde BAL sıvı analizi, PAP tanısını kuvvetle düşündürür.

### **2.5.13. Alveolar Hemoraji Sendromları**

Diffüz alveoler hemoraji (DAH), muhtemelen bir immünolojik veya otoimmün bozuklukla ilişkili mikrovasküler hasara bağlı olarak distal hava boşluklarına yaygın kanama ile birlikte pulmoner hemorajinin ayrı bir alt kümesini ifade eder (84). Yaygın DAH yaşamı tehdit edici olabileceğinden, DAH'ın erken tanınması önemlidir, solunum yetmezliği ve son dönem böbrek hastalığı riskini azaltabilir. Hemoptizi olmaması nedeniyle tanı sıklıkla gecikmektedir.

Ayrıca, alveoler hemoraji, kanama diyatezi varlığının yüksek olasılığından dolayı invaziv diagnostik prosedürlerin riskli olduğu kemik iliği veya kök hücre transplantasyonu (85) dahil olmak üzere immün sistemi baskılanmış hastalarda sık görülür. Bu durumda, BAL sadece daha az invaziv ve daha az riskli olmakla kalmaz, aynı zamanda bu hastalarda sıklıkla tanımlanmış olan enfeksiyonların tanısında da etkilidir.

BAL verilerinden DAH'ın net bir tanımı yapılmamıştır, tüm alikuotlarda oldukça kanlı BAL sıvısının ya da en az üç farklı örnekten alınan her verilmiş alikuot ile gittikçe artan kanlı BAL sıvısının DAH'ı tanımladığını ve bu durumun bazı hastalarda otopside patolojik olarak doğrulandığı gösterilmiştir. Pulmoner komplikasyonlardan ölen 77 hastayı inceleyen bir çalışmada, DAH tanılı ve otopsi yapılan 8 hastanın 4'ünde BAL sıvısının normal olağan görünümü izlenmiş, fakat DAH tanısı olmayan 13 hastanın 7'sinde de hemorajik BAL sıvısı görülmüştür (86). Kanlı BAL sıvısı her ne kadar düşündürücü olsa da özellikle trombositopeni veya diğer koagülopati durumları varlığında tek başına DAH'ın kesin bir belirtisi değildir. Ayrıca, belirgin kanama görülmeyen BAL sıvısı, DAH olasılığını dışlamaz.

Hemosiderin yüklü makrofajların çok sayıda görülmesi daha spesifiktir ve alveolar hemoraji için makul bir belirteçtir. Bununla birlikte, alveolar makrofajlarda hemosiderin yokluğu alveolar hemoraji olasılığını dışlamaz, çünkü hayvan deneyleri ve insan çalışmaları BAL sıvısı makrofajlarında hemosiderin saptanması için hemorajinin hava boşluklarına girmesinden en az 48–72 saat sonra BAL yapılması gerektiğini göstermişlerdir (87). Kronik kanamalarda siderofajlar alveolar boşluklarda daha uzun süre birikme eğilimindedir ve kanama durduktan birkaç ay sonra BAL sıvısında görülebilir. Fakat miktar tayini olmaksızın sadece siderofajların varlığı akut hemorajiyi teşhis etmek için yetersizdir. Golde ve arkadaşları alveolar makrofajlardaki (AM) hemosiderin yükünü hesaplanması için çeşitli demir boyamaları ile bir skorlama sistemi geliştirmişlerdir (88).

DAH'de hemoptizi her zaman olmamakla birlikte genellikle mevcuttur. Akciğer grafisinde yaygın olan iki taraflı alveolar infiltrat olması durumunda DAH'den şüphelenilmeli ve tanısal bronkoskopi/BAL erken yapılmalıdır. Her bir alikuotta geri alınan kanlı sıvıdaki artış, tek başına tanısal olmamasına rağmen şüphe uyandırır. Muhtemel enfeksiyonlar ve mikrobiyolojik çalışmalar için BAL sıvısı gönderilmeli ve sitospin lamaları demir (Prusya mavisi veya Perls) için boyanmalıdır. BAL sıvısında %20'den fazla siderofaj olması veya Golde (hemosiderin) skorunun 100'den fazla olması anlamlı göstergelerdir.

#### 2.5.14. İlaça Bağlı İnterstisyel Akciğer Hastalığı

Çok sayıda ilaç potansiyel olarak pnömotoksiktir ve radyolojik infiltratlara neden olabilir. Başlangıçta ve klinik prezentasyonda akut ile kronik arasında değişebilen ilaç kaynaklı İAH sendromları, geniş bir yelpazede birçok pulmoner patolojiyi kapsar ve bunlar akut nonkardiyojenik pulmoner ödem, eozinofilik pnömoni, hipersensitivite pnömonisi, ilaca bağlı lupus, pulmoner fibrozis, alveolar hemoraji ve yaygın alveolar hasarı içeren ilişkili radyolojik paternleri (89) içerir. Bununla birlikte, radyolojik infiltratlara bir ilaca maruz kalmanın neden olup olmadığını kesin olarak belirlemek için genel olarak kabul edilen kriterler yoktur ve ilaca bağlı pnömotoksiste genellikle idiyosenkratik bir reaksiyondur. En yaygın iki ilaç ilişkili İAH paterni, (1) hava yolları veya periferik kan eozinofilisi ile ilişkili olabilecek nispeten akut bir hipersensitivite pnömonisi ve (2) subakuttan kroniğe kadar bazı İİP formlarını taklit edebilen ve bir dereceye kadar fibrozis içeren formlara aittir (89).

BAL'da artan sayıda nötrofil, eozinofil ve/veya lenfosit bulunabilir ve mast hücreleri ve/veya plazma hücreleri de tanımlanabilir. Akciğere göç eden ve BAL sıvılarında geri kazanılan inflamatuvar hücreler, belirli bir ilacın toksik reaksiyonuna tepki olarak belirli bir bireyin pro-inflamatuvar gen ekspresyonu (yani sitokinler ve kemokinler) ile birleştirilmiş özel bir ilacın neden olduğu akciğer inflamasyonunun tipini yansıtabilir.

Uygun klinik ve YÇBT bulguları ile kombine edildiğinde BAL hücre profilleri (örn., BAL sıvısında lenfositoz veya eozinofili), ilaca bağlı İAH teşhisini destekleyebilir. BAL sıvısı analizi, pulmoner hemoraji veya enfeksiyon gibi diğer potansiyel antiteleri dışlamak için de kullanılabilir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Kliniği'nde 2017 ve 2018 yılında difüz parankimal akciğer hastalığı nedeni ile tanı amaçlı fleksibl bronkoskopi ile bronkoalveolar lavaj uygulanan ve BAL sıvıları hem optik mikroskopta hem de akım sitometri cihazında incelenen 54 hasta geriye dönük olarak dahil edildi. Demografik bilgiler ve klinik tanımlar Tablo 8'de belirtilmiştir.

**Tablo 8: Çalışmaya Alınan Nüfusun Demografik Özellikleri ve Tanıları**

<b>Denekler</b>	
n	54
erkek	36
kadın	18
<b>Yaş</b>	
Ortalama ± SS	59,31 ± 15,13
Aralık	23-82
<b>Sigara Kullanımı</b>	
Halen Kullanmakta	12
Kullanıp Bırakmış	23
Hiç Kullanmamış	19
<b>Akciğer Hastalıkları</b>	
Akciğer Kanseri	2
Antrakoz	1
Behçet Akciğer tutulumu	1
Bronşiyal Atrezi	1
Eozinofilik Pnömoni	1
Fibroatelektazi	1
İPF	2
Fibrotik Nonspesifik İnterstisel Pnömoni	1
Kollajen Doku Hastalığı Akciğer Tutulumu	1
KOAH ve Fibrotik değişiklikler	1
Kömür İşçisi Pnömokonyozu	9
Kronik. Hipersensitivite Pnömonisi	1
Lenfoma	1
Meme Kanseri Metastazi	1
Organize Pnömoni	2
Pnömoni	3
Respiratuar Bronşiolit ile İlişkili İnterstisyel Akciğer Hastalığı	4
Romatoid Artrit Akciğer Tutulumu	5
Sarkoidoz	11
Siderozis	1
Silikozis	1
Sjögren Akciğer Tutulumu	1
Tüberküloz	2

#### 3.1. Hastanın Hazırlanması

Bronkoskopi işlemi uygulanmadan önce işlem uygulanacak her hastanın fizik muayenesi, tam kan sayımı, rutin biyokimyasal analizleri; özellikle açlık kan şekeri,



üre ve kreatinin değerleri, koagülasyon testleri (APTT, PT ve INR), kalp elektrokardiografisi, düz ve yan akciğer grafileri, solunum fonksiyon testleri yapılmış ve BAL uygulanacağı için hastaların toraks yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografileri (YÇBT) veya toraks bilgisayarlı tomografileri incelemeleri yapılmıştı.

Hastaların, işlemin gerekliliği, işlem prosederü ve kontrendikasyonları konusunda bilgileri olduğuna dair sözlü ve yazılı onamları mevcuttu.

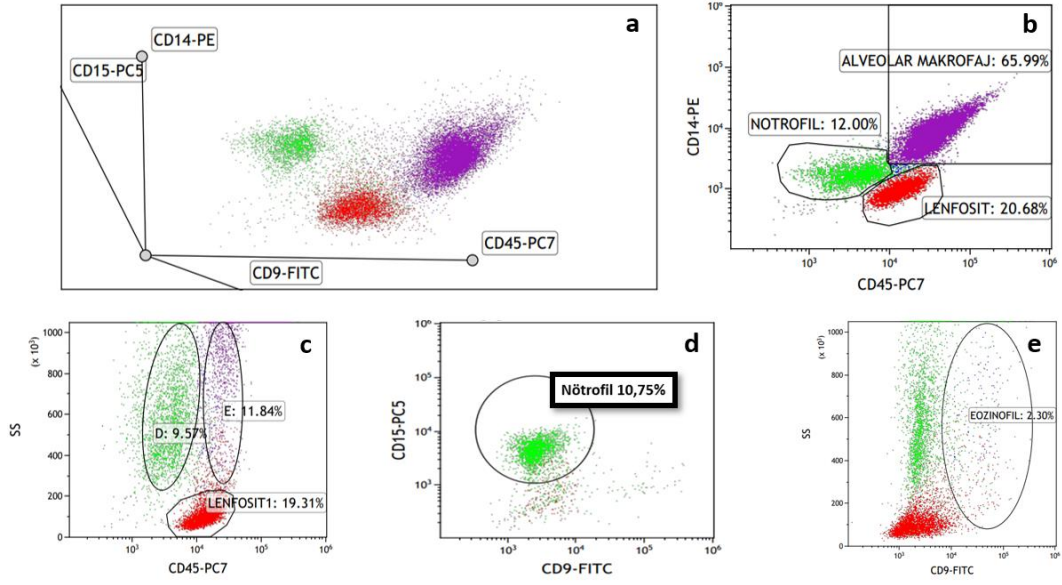
İşlemden yaklaşık 6 saat öncesinde hastaların katı ve sıvı beslenmeleri kesilmişti. Hastalar daha sonra sürekli kardiyak ve nabız oksimetre monitörlerine yerleştirilerek ek oksijen desteği verilmiş (genellikle 2 ila 4 L/dk. nazal kanül ile) ve intravenöz erişim sağlanmıştı. Orofarenks ve her iki burun pasajı %1-2'lik lidokain ile topikal olarak anesteziye tabi tutulmuştu. Posterior gag refleksinin inhibe edilmesinden sonra bronkoskopi işlemine başlanmıştı.

### **3.2. BAL İşleminin Uygulanması**

Fleksibl bronkoskopi ile rutin değerlendirme yapıldıktan sonra YÇBT ya da bilgisayarlı tomografi ile belirlenen BAL uygulanacak bronkopulmoner segment girişine bronkoskopun distal ucu kama şeklinde yerleştirilerek oda ısısındaki toplam 120 ml salin solüsyonu 3 alikuoat halinde verilip ve aspire edilmişti. Alınan BAL sıvısı mikrobiyoloji, patoloji ve immünoloji laboratuvarlarına gönderilmek üzere polipropilen kaplı plastik kaplara konularak yaklaşık bir saat içerisinde laboratuvarlara gönderilmiş ve geri kazanılan BAL sıvısı, 41-lm'lik bir filtreden (Millipore, Billerica, MA) süzölmüşti.

### **3.3. BAL Sıvısının Hücresel Analizinin Yapılması**

BAL sıvısı diferansiyel hücre sayımı hem direk optik mikroskopi hem de akım sitometrik yöntem ile yapıldı.



**Şekil 6: Flow Sitometri de BAL sıvısı diferansiyel hücre sayımı grafikleri. a) Mantıksal Kapılama b) CD45 ve CD14 e göre alveolar makrofaj, nötrofil, lenfositlerin hesaplanması c) CD45+ ve SSC da düşük granülositli lenfositler d) CD9- ve CD15+ olan nötrofiller e) CD9+ ve SSC de yüksek granülositli eozinofiller**

Hastanemizde akım sitometrisi ölçümünde 4 renkli Cytometers Fc500, Beckman Coulter cihazı kullanılmaktaydı. Hastanemiz immünoloji laboratuvarında BAL sıvısı diferansiyel hücre sayımından lökositlerin boyanması için CD45-Phycoerythrin Cyanin 7(PC7), CD15- Phycoerythrin Cyanin 5 (PC5), CD14-Phycoerythrin (PE) ve CD9-Fluorescein isothiocyanate (FITC); granüllü ve granülsüz hücrelerin ayrıştırılması için flow sitometrinin Side Scatter Chanel dedektörü kullanılmaktaydı. Kullanılan monoklonal antikorların ve dedektörlerin özellikleri Tablo 9’da belirtilmiştir. Lenfositler CD 45 ile parlak boyanan ve Side Scatter Chanel (SS) de granülsüz izlenen hücreler olarak; nötrofiller CD 15 parlak boyanan, CD 9 negatif hücreler olarak; eozinofiller CD 9 parlak boyanan ve SS de yüksek granüllü izlenen hücreler olarak; alveolar makrofajlar (AM) CD 45 parlak ve CD 14 parlak boyanan hücreler olarak tanımlanmıştı. Fakat alveolar makrofajlar, hem CD 9 parlak eozinofiller hem de CD 15 parlak boyanan nötrofiller ile karışım gösteriyordu. Mantıksal kapılama yapılarak CD 45 ve CD 14 parlak AM’ler CD 9/SS ve CD 9/CD 15 grafiklerinden çıkarılarak karışimsız eozinofil ve karışimsız nötrofil grafikleri yapılarak ve hesaplamalar bu grafikler üzerinden yapılmıştı (Şekil 6).

**Tablo 9: Çalışmada Hücreleri Sınıflandırmada Flow Stimoteride Kullanılan Monoklonal Antikorlar ve Dedektörler**

Monoklonal Antikor	Diğer Adlandırma	Hücre İfadesi	Ligand / Reseptör	Fonksiyon
<b>CD45</b>	Leukocyte Common Antigen (LCA), T200, B220, Ly5, Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC)	Eritrositler ve trombositler hariç hematopoetik hücreler	Galectin-1, w/ CD2, CD3, CD4 and CD45AP	T- ve B-hücresi antijen reseptör sinyalinin regülatörü; hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenleyicisi
<b>CD15</b>	X-Hapten, Lewis X, SSEA-1, 3-FAL, FUT4	Granülasitler (Nötrofiller, eozinofiller ve makrofajlar)	Selektinler, CD62	Adezyon, granülosit aktivasyonu
<b>CD14</b>	LPS-Reseptör	Monositler, makrofajlar, Langerhans hücreleri, granülositler (düşük)	Endotoksin, Lipopolisakkarit (LPS), TLR4, LBP, LY96, TLR2	LPS bağlama ve TLR sinyalleri yoluyla doğal immün yanıt
<b>CD9</b>	p24, DRAP-1, MRP-1	Trombositler, bazofiller, endotelial ve epitelyal hücreler, pre B lenfositler, T lenfositler ve kök hücreler	CD63, CD81, CD82, CD41/CD61, HLA-DR, Integrin $\beta$ 1, PI4-Kinase	Trombosit aktivasyonu ve agregasyonu, hücre adezyonu ve hücre motilitesi
<b>Side Scatter Channel (SSC) Detektör</b>	Partiküllerin granüler içerikleri, iç yapısı hakkında bilgi verir. Flow sitometride granülositer serinin belirlenmesinde kullanılır.			

Akım sitometrisi işlemi için filtreden geçirilen ve hazırlanan BAL sıvısı numuneleri EDTA (ethylenediaminetetraacetic asid) içeren kaplara aktarılarak optik mikroskopide değerlendirilmek üzere patoloji laboratuvarına gönderilmişti. BAL sıvısı numunelerinden sitospin preparatları hazırlanarak deneyimli bir patolog tarafından optik mikroskopide 400x optik büyütme ile diferansiyel hücre sayımı yapıldı, bunun için 400 hücre sayıldı ve hücrelerin (alveolar makrofajlar, lenfositler, nötrofiller, eozinofiller) toplam hücre sayısına göre oranları belirlendi.

### 3.4. İstatistiksel Analiz

Değişkenler medyan ve ilk-üçüncü çeyreklik olarak rapor edildi. Veriler normal dağılım göstermediği için (Shapiro-Wilk- testi) logaritmik dönüşüm uygulandı. Optik mikroskopi ve akım sitometri yöntemleri ile hücre populasyonları (makrofaj, lenfosit, nötrofil) arasında fark olup olmadığı Wilcoxon işaretli sıra testi ile test edildi. Her iki yöntem arasında uyum varlığı ise Bland Altman analizi ile incelendi. Bu analiz; her iki hücre sayım yöntemi ile ölçülen değerler arasındaki farkın optik mikroskopiye değişimini ifade ediyordu (90). Eozinofiller için her örnekte eozinofil sayımı yapılamadığı için Bland Altman analizi uygulanamadı. Onun yerine her iki yöntem arasında eşleştirilmiş trendi göstermek üzere çok değişkenli nokta ve çizgi diyagramları kullanıldı. İstatistiki analiz için SPSS ve MedCalc paket programları kullanıldı. İstatistiki anlamlılık  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

54 hastanın BAL sıvısı örnekleri her iki yöntemle de analiz edildi. Her iki yöntemin tanımlayıcı istatistikleri (FCM ve optik mikroskopi) Tablo 10'da özetlenmiştir. Makrofaj sayılarının FCM'deki medyan değeri %75.20 (53.38-86.25), optik mikroskopide %72.95 (58.16-82.73); nötrofil sayılarının FCM'deki medyan değeri %4.0 (1.45-11.43), optik mikroskopide %4.95 (1.73-19.95); lenfosit sayılarının FCM'deki medyan değeri %6.55 (1.98-19.7), optik mikroskopide %14.55 (10.25-23.28) ve eozinofil sayılarının FCM'deki medyan değeri %2.85 (1.68-4.50), optik mikroskopide 0 (0) olarak bulundu.

**Tablo 10: Tanımlayıcı İstatistikler, Lökosit Sayı Oranlarının Ortalama Değerleri**

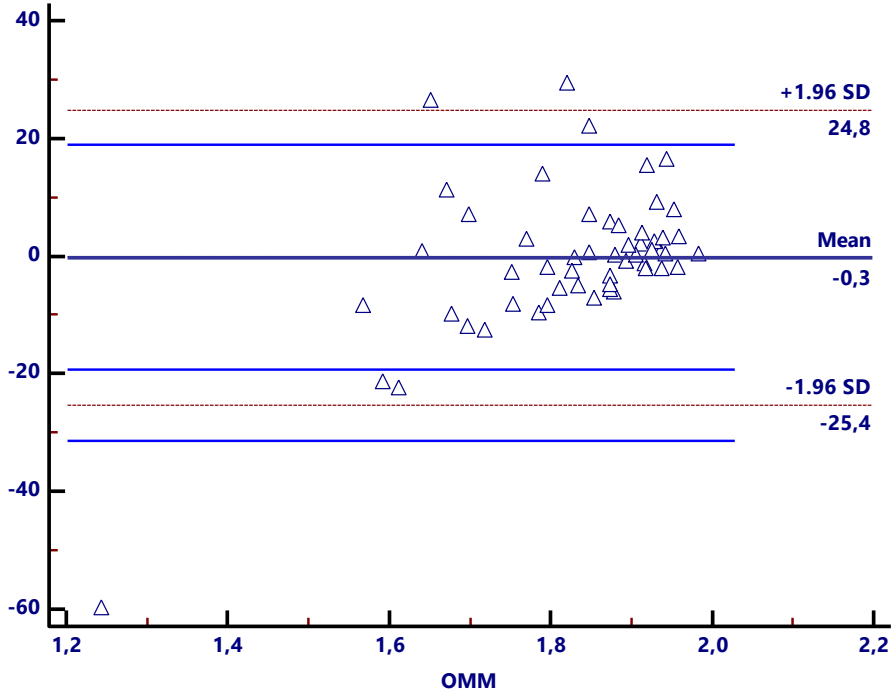
	Optik Mikroskopi	Akım Sitometri	P değeri †
<b>Makrofaj</b>	72.95 (58.16-82.73)	75.20 (53.38-86.25)	0.820
<b>Nötrofil</b>	4.95 (1.73-19.95)	4.0 (1.45-11.43)	0.280
<b>Lenfosit</b>	14.55 (10.25-23.28)	6.55 (1.98-19.7)	0.005
<b>Eozinofil</b>	0 (0)	2.85 (1.68-4.50)	< 0.001

†Wilcoxon işaretli sıra testi  
Veri; yüzde (Q1-Q3) olarak sunulmuştur.

Her iki yöntemle analiz edilen her bir lökosit popülasyonu için yapmış olduğumuz parametrik olmayan Wilcoxon işaretli sıra testi ile FCM ve optik mikroskopideki lenfosit ve eozinofil sayıları arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (sırasıyla  $p=0.005$ ,  $p<0.001$ ). Bununla birlikte FCM ve optik mikroskopi ile hem alveolar makrofajlar hem de nötrofiller arasındaki sayısal fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla  $p=0.820$ ,  $p=0.280$ ).

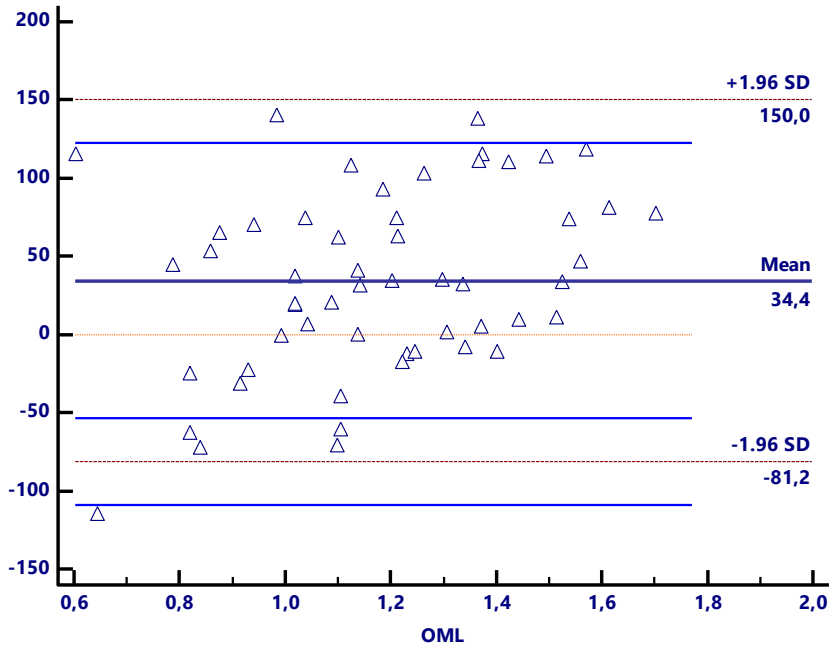
Bland-Altman analizi sonucunda FCM'nin optik mikroskopi ile karşılaştırıldığında lenfosit sayılarını %34.4 (%95 güven aralığı [CI] = -50,4798 to -18,2783) oranında düşük tahmin ettiğini ve yine nötrofil sayısını %14 (%95 güven aralığı [CI] = -47,1518 to 18,8497) oranında düşük tahmin ettiğini belirledik (Şekil 8). Bununla birlikte alveolar makrofaj popülasyonlarının dağılımı homojendi (ortalama %-0.3, %95 güven aralığı [CI] = -3,2154 to 3,77587) (Şekil 7). Eozinofillerin çok değişkenli nokta ve çizgi diyagramları, sayılan eozinofiller hesaba katıldığında akım

sitometri ile optik mikroskopi arasında belirgin bir fark olmadığını gösterdi (Şekil 9). Diğer taraftan akım sitometri yönteminde, optik mikroskopiden daha fazla eozinofil sayıldığı saptandı.

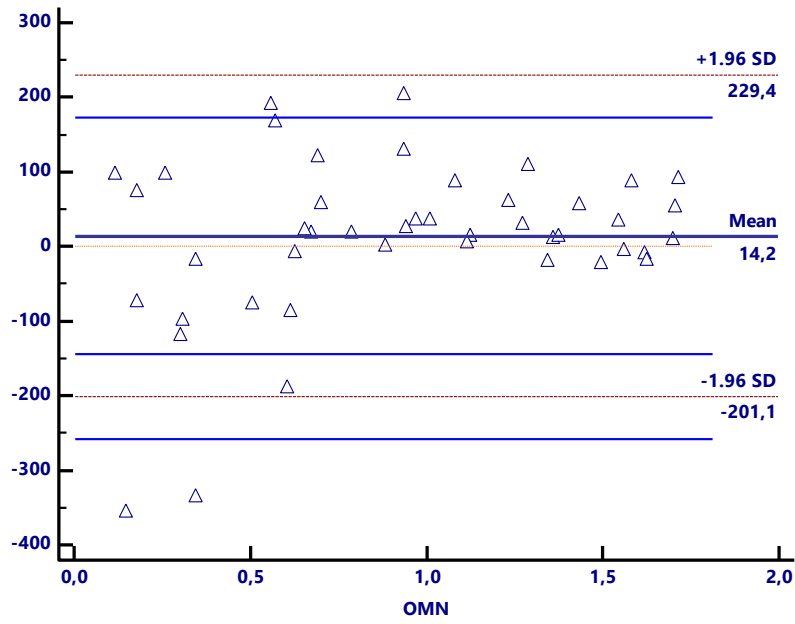


A

Şekil 7: Optik mikroskopi ve FCM arasındaki Bland-Altman analizi. X eksenini, optik mikroskop ile elde edilen sayıları temsil eder ve Y eksenini, her bir BAL lökosit popülasyonu için her iki yöntemle elde edilen değerler arasındaki fark yüzdesini gösterir: A: Makrofajlar, OMM: optik mikroskopi makrofaj, FSM: flow sitometri makrofaj

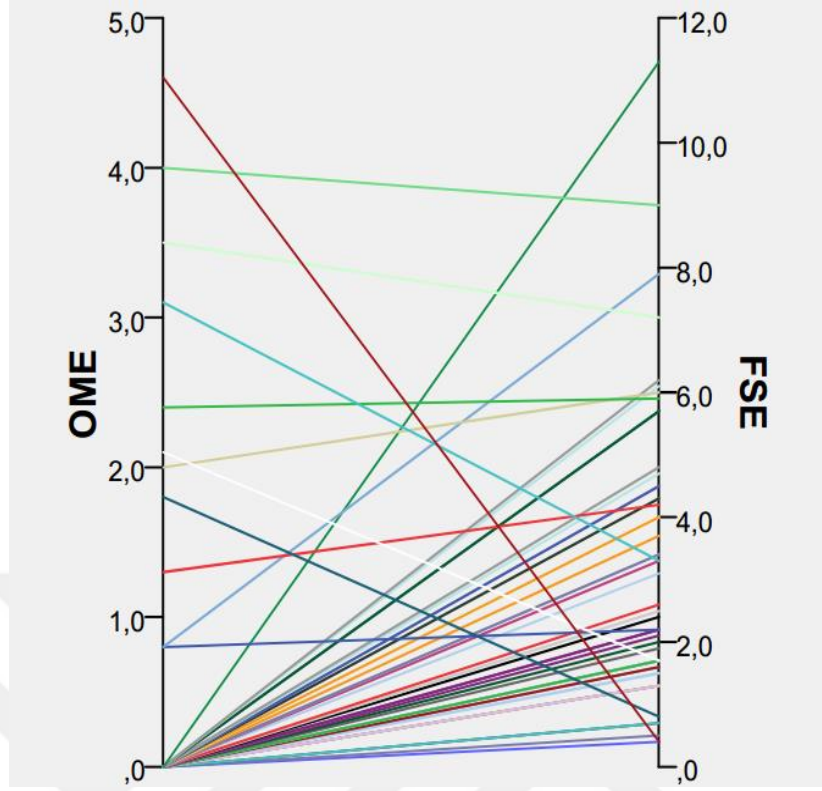


B



C

Şekil 8: Optik mikroskopi ve FCM arasındaki Bland-Altman analizi. X eksenini, optik mikroskop ile elde edilen sayıları temsil eder ve Y eksenini, her bir BAL lökosit popülasyonu için her iki yöntemle elde edilen değerler arasındaki fark yüzdesini gösterir: B: Lenfositler, C: Nötrofiller, OML: optik mikroskopi lenfosit, FSL: flow sitometri lenfosit, OMN: optik mikroskopi nötrofil, FSN: flow sitometri nötrofil



**Şekil 9: Eozinofil popülasyonu için çoklu değişkenler (sitometri ve optik mikroskopi) için nokta ve çizgi diyagramları. Diyagram, sitometri ve optik mikroskopi ile ölçülen her bir numunenin değerini temsil eder. OME: optik mikroskopi eozinofil, FSE: Flow sitometri eozinofil.**



## 5. TARTIŞMA

Diffüz parankimal akciğer hastalıklarının (DPAH) tanısal yaklaşımında bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısının hücresel incelemesi sıklıkla uygulanan ve nispeten noninvazif bir yöntemdir. Tıbbi öykü (örneğin mesleki ve çevresel etkenlere maruz kalma, ilaç alımı, daha önce radyoterapi alımı), fizik muayene ve radyolojik bulgular ile beraber ele alındığında BAL sıvısı hücresel profilinin tanısal gücü artar.

L. Welker ve arkadaşları 1971 hastada üzerinde yaptıkları BAL hücre profilinin tanıya katkısını inceleyen çalışmalarında, İAH şüphesi olan grupta düşük granülosit sayısı ile birlikte lenfosit sayıları %30–50 arasında olduğunda sarkoidoz olasılığının %33.7'den %68.1'e yükseldiğini; lenfosit ve granülosit sayıları birlikte yüksek olduğunda ise OİP olasılığının %15.8'den %33.3'e yükseldiğini saptamışlardır (59). Diğer taraftan nadir hastalıklarda BAL'ın kullanımının sınırlı olduğu görülmüştür. Bu veriler, bronkoalveolar lavaj hücre sayımlarının, sarkoidoz, eozinofilik pnömoni ve olağan interstisyel pnömoni gibi nispeten sık görülen hastalıklarda önemli teşhis bilgileri sağladığını ve seyrek hastalıklarda katkısının sınırlı olduğunu göstermektedir.

American Thoracic Society (ATS) tarafından 2012 yılında BAL sıvısı hücre analizinin klinik önemine değinilen bir klavuz yayınlanmış ve önerilerde bulunulmuştur (91). YÇBT gibi yeterli torasik görüntüleme ve kapsamlı klinik bilgi ile birlikte kullanıldığında, BAL sıvısı hücre profillerinin İAH şüphesi olan hastaların tanısal değerlendirmesinde yararlı bilgiler sağlayacağı belirtilmiştir. ATS klavuzunda sigara içmemiş normal erişkinde BAL sıvısı hücre popülasyonları oranları sırasıyla; alveolar makrofajlar >%85, lenfositler %10-15, nötrofiller ≤%3, eozinofiller ≤%1 ve epitel hücreleri ≤%5 olarak belirtilmiştir. Bu klavuzda nötrofilik patern >%3 nötrofil, lenfositik patern >%15 lenfosit ve eozinofilik patern >%1 eozinofil olarak tanımlanmıştır. BAL diferansiyel hücre profilinde tanımlanan hücresel paternlere ek olarak ilgili hücre grubundaki artışın büyüklüğü de ayırıcı tanı spektrumunun daraltılmasında yardımcıdır. Lenfositlerin >%25 olmasının, olası granüloamatöz hastalığa (sarkoidoz, aşırı duyarlılık pnömonisi veya kronik berilyum hastalığı), hücresel nonspesifik interstisyel pnömoniyeye, ilaç reaksiyonuna, lenfoid interstisyel pnömoniyeye, kriptojenik organize pnömoniyeye veya lenfomaya işaret ettiği; lenfositlerin >%50 olmasının olası hipersensitivite pnömonisi veya hücresel nonspesifik

interstisyel pnömoniye düşündüreceği; nötrofillerin >%50 olması akut akciğer hasarı, aspirasyon pnömonisi veya süpüratif enfeksiyonu destekleyeceği; eozinofillerin >%25 olması, akut veya kronik eozinofilik pnömoni için neredeyse tanı koydurucu olduğu ATS klavuzunda belirtilmektedir.

BAL hücresel profilinin değerlendirilmesi için sıklıkla optik mikroskopide sitospin preparatları ile 400 hücre sayımı metodu kullanılmaktadır ve standart yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem; zaman alıcıdır, sayılan düşük hücre sayısı, kişiye bağımlılık nedeniyle subjektiflik içermesi ve örneklerdeki hücrelerin sayımını zorlaştıran bronşiyal epitel ya da kontaminasyon hücreleri gibi nonlökosit hücrelerin varlığı nedeniyle değişkenlik gösterdiği bilinmektedir (92).

Flow sitometri (FCM), lenfositleri, makrofajları ve granüositleri kolayca ayırt edip, lenfosit alt grupları hakkında ayrıntılar sağlar. Bununla birlikte FCM ile BAL sıvısı hücresel profilinin belirlenmesi hakkında bilgi literatürde sınırlıdır. BAL örneklerinde FCM kullanan çalışmaların çoğu, sadece lenfosit alt gruplarına odaklanarak BAL analizine yönelik önyargılı bir görüş sağlamıştır. FCM de BAL sıvısı hücresel profilinin değerlendirilmesi daha hızlıdır, kişiye bağımlı olmadığından öznellik yoktur ve hücrelere spesifik antikorlar kullanıldığı için lökosit dışı elemanlardan etkilenmesi minimaldir. Fakat hangi monoklonal antikorların kullanılacağına dair bir klavuz ya da görüş birliği yoktur. Farklı çalışmalarda farklı antikor kombinasyonları kullanılmış ve bunların olumlu ya da olumsuz sonuçları belirtilmiştir.

Bu çalışmanın amacı BAL sıvısının hücresel profilinin daha hızlı ve optik mikroskopiye göre daha objektif bir yöntem olan FCM ile elde edilmesi ve sonuçlarının optik mikroskopisi ile elde edilen bilgilerle karşılaştırılarak optik mikroskopisi yerine kullanımının uygunluğunu ya da üstünlüklerini belirleyebilmektir.

Elde ettiğimiz sonuçlar flow sitometri ile hücre immunofenotip ekspresyonuna dayanan BAL lökositlerinin sayılmasının uygun olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte bulgularımız diğer çalışmlarla karşılaştırıldığında bazı farklılıklar gösteriyordu. Bu durum kullandığımız antikor profilinden kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda FCM de lökosit popülasyonlarının belirlenmesi için CD45, CD15, CD14 ve CD9 antikorlarını kullandık. Çalışmada hematopoietik hücrelerde ifade edilen CD45'i kullanarak BAL sıvısında CD45 pozitif alveolar makrofajlar,

nötrofiller, lenfositler ve eozinofilleri kapıladık. Daha önce Lourdes Tricas ve Simon M. Barry nin yapmış olduğu çalışmalarda da FCM'de lökositlerin kapılanması için CD45 antikoru kullanılmıştır. CD45, PTPRC (protein tyrosine phosphatase receptor type C) olarak da bilinen protein tirozin fosfataz ya da lökosit ortak antijen (LCA) olarak adlandırılır, PTPRC geni tarafından kodlanan bir enzimdir (93, 94). Bu antijen hücre büyümesi, farklılaşması, mitotik döngüsü ve onkojenik transformasyon dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçleri düzenleyen sinyal molekülüdür. PTPRC geni hematopoitik hücrelerde spesifik olarak ifade edilir; CD45, hematopoezde sinyal transdüksiyonunun düzenlenmesinde rol oynayan tirozin fosfataz aktivitesine sahip bir pan-lökosit proteindir. T ve B hücresi antijen reseptörü sinyallerinin temel bir düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir. CD45, antijen reseptör komplekslerinin bileşenleri ile doğrudan etkileşerek veya antijen reseptör sinyalleri için gerekli çeşitli Src ailesi kinazlarını aktive ederek çalışır. Bu PTP (protein tyrosine phosphatase) ayrıca JAK kinazları da durdurur ve böylece sitokin reseptörü sinyallerinin negatif bir regülatörü olarak işlev görür.

Bizim çalışmamızda; FCM de CD45 pozitifliği ile birlikte SSC dedektörde granülsüz seçim özelliğini lenfositlerin tanımlanması için optimal yöntem olarak belirlenmişti. Bazı araştırmacılar, BAL lenfosit analizi için optimum stratejinin, CD45'i ilk kez geçtikten sonra bir DNA boyası olan LDS-751 kullanarak analizden hasar gören hücreleri ortadan kaldırmak olduğunu ileri sürmüşlerdir (95). Lenfositlerin fonksiyonel ve fenotipik analizi için hasarlı hücrelerin ekarte edilmesi gerekli olsa da çalışmamız BAL sıvısı lökositlerinin son derece dayanıklı olduğunu, donmadan önemli ölçüde etkilenmediğini, ayrıca CD45 ekspresyonu ve ışık saçılım özelliklerinin yeterli olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda optik mikroskopiye kıyasla FCM'nin lenfositleri daha düşük sayma eğiliminde olduğunu belirledik (optik mikroskopide lenfosit oranı: %14.55 (10.25-23.28), akım sitometride lenfosit oranı: %6.55 (1.98-19.7), p: 0.005). Uyum analizinde; optik mikroskopi ile FCM arasındaki lenfosit sayısı arasındaki fark incelediğinde %34 oranında optik mikroskopide daha düşük lenfosit sayısı saptandığı görüldü. Bunun nedeni optik mikroskopide sitoplazmasını kaybeden makrofajların lenfosit olarak sayılabilmesi nedeniyle mikroskopide lenfositlerin daha fazla sayılabilmesi olabilir. Ayrıca T lenfositlerin FCM de CD14 yüzey antijenine sahip olması nedeniyle alveolar makrofaj olarak

sayılabilmesi de başka bir neden olarak sayılabilir. Lourdes Tricas ve arkadaşlarının 2012 de yapmış olduğu çalışmada ise FCM'de lenfosit sayıları daha yüksekti (90). Lourdes Tricas'ın çalışmasında 34 BAL örneği üzerinde lökosit popülasyonlarının belirlenmesi için CD45, CD16, CD15 ve HLA-DR antikorları kullanılmıştır, alveolar makrofajlar HLA-DR+/CD16+, nötrofiller HLA-DR-/CD16+, lenfositler CD15-/CD16+, eozinofiller CD15+/CD16- olarak tanımlanmıştır. Tricas ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada FCM nin optik mikroskopiye kıyasla alveolar makrofajları daha düşük ve lenfositleri daha yüksek gösterme eğiliminde olduğu belirtilmiştir. Nötrofiller HLA-DR ekprese edebileceğinden Lourdes Tricas'ın çalışmasında FCM'de nötrofillerin düşük sayılmasına ve alveolar makrofajların yüksek sayılmasına neden olmuş olabilir (96).

CD45 pozitif hücrelerde CD15 pozitifliği ile birlikte CD9 negatifliğini nötrofillerin tanımlanması için kullanılmıştı. Daha önce Barry ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da CD45+/CD15+ olarak kapılanan hücreler nötrofil olarak tanımlanmıştı (97). CD15 (3-fukosil-N-asetil-laktosamin), glikoproteinler, glikolipidler ve proteoglikanlar üzerinde ekprese edilebilen bir karbonhidrat adezyon molekülüdür (98). Bu molekül nötrofiller üzerinde bulunan fagositoz ve kemotaksise aracılık eder. Aynı zamanda Lewis X ve SSEA-1 (evre-spesifik embriyonik antijen 1: stage-specific embryonic antigen 1) olarak da adlandırılır ve FUT4 (fukosiltransferaz 4) ve FUT9 ile sentezlenir (99, 100). CD15 yüzey antijeni nötrofillere ek olarak monositler, eozinofiller ve bazofillerde de bulunur. Çalışmamızda nötrofillerin eozinofillerden ayrılmasında CD9 negatifliğini kullanılmıştı. Barry bu ayırım için IgE reseptör antijeni CD23'ü , Lourdes Tricas ve arkadaşları ise CD16 pozitifliğini kullanmıştır (90, 97). Çalışmamızda optik mikroskopiye kıyasla FCM'nin %14,2 oranında nötrofilleri daha düşük oranda sayma eğiliminde olmasına karşın istatistiksel olarak fark olmadığını belirledik (optik mikroskopide nötrofil oranı: 4.95 (1.73-19.95) / FCM'de nötrofil oranı: 4.0 (1.45-11.43), p: 0.280). Tricas ve Barry'nin çalışmasında da optik mikroskopi ve FCM arasında nötrofil sayımında fark görülmemiştir. Nötrofiller de monositler/makrofajlar gibi CD14 antijenini ekprese ederler, fakat bunu monositlere göre daha düşük oranda gerçekleştirirler (101). Bu durum FCM de nötrofillerin yanlış hesaplanmasına yol açabilir. Nötrofillerin CD14 yüzey antijenine sahip olması nedeniyle FCM'de alveolar makrofaj olarak sayılabileceğini bununda

FCM de görmüş olduğumuz daha düşük nötrofil sayma eğilimine neden olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda CD45 pozitif hücrelerde CD9 pozitifliğine sahip ve SSC dedektörde granüllü olan hücreleri eozinofil olarak belirlenmişti. CD9 antijeni, insanlarda CD9 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Bu gen tarafından kodlanan protein, tetraspanin ailesi olarak da bilinen transmembran 4 süper ailesinin bir üyesidir. Bu üyelerin çoğu, dört hidrofobik alanın varlığıyla karakterize edilen hücre yüzeyi proteinleridir. CD9, eozinofiller ve trombositler tarafından ifade edilir. Hücre gelişimi, aktivasyonu, büyümesi ve hareketliliğinin düzenlenmesinde rol oynayan sinyal iletim olaylarına aracılık eder. CD9 eksozomların yüzeyinde bulunur ve hücre adezyonunu ve göçünü düzenleyebilir ve ayrıca trombosit aktivasyonunu ve agregasyonunu tetikleyebilir (102). Eozinofiller CD15 antijenini eksprese ettiğinden nötrofillerden ayırmak için IgE reseptör antijeni olan CD23 antijenini kullanan Simon Barry'den farklı olarak CD9 antijen pozitifliğini kullandık. Tricas ve arkadaşları nötrofil ve eozinofil ayırımı için CD16 antijenini kullanmış, CD15 pozitif / CD16 negatif hücreleri eozinofil olarak tanımlamıştır. FCM ve optik mikroskopi karşılaştırıldığında FCM'nin daha yüksek eozinofil sayılarına ulaştığını belirledik, bunun nedenleri arasında optik mikroskopide sadece 400 hücre üzerinden değerlendirme yapılması ve FCM'nin alveol hücre popülasyonunu daha iyi yansıtması olabilir. Bir diğer nedeni ise alveolar makrofajların FCM'de eozinofiller ile karışım göstermesi nedeniyle FCM de daha yüksek sayıda eozinofil sayısına ulaşılması olabilir.

Makrofajların seçimi için CD14 antijenini kullandık. CD14 proteini, kalıtsal immün sistemin bir bileşenidir. CD14, bir glikozilfosfatidilinositol kuyruk (mCD14), diğeri ise çözünür bir form (sCD14) ile membrana bağlanan iki biçimde bulunur. CD14, bakteriyel lipopolisakkaritin (LPS) saptanması için bir ko-reseptör (Toll-like reseptör TLR4 ve MD-2 ile birlikte) görevi görür (103). CD14 sadece lipopolisakkarid bağlayıcı protein (LBP) varlığında LPS'ye bağlanabilir. LPS, ana ligandı olarak kabul edilmesine rağmen, CD14 ayrıca lipoteikotik asit gibi diğer patojen ile ilişkili moleküler paternleri de tanır. CD14 esas olarak makrofajlar ve az miktarda nötrofiller tarafından ifade edilir. CD14+ monositler, GM-CSF ve IL-4 dahil olmak üzere sitokinler tarafından teşvik edilen bir farklılaşma yolu ile dendritik hücreler de dahil olmak üzere bir dizi hücreye farklılaşabilir. CD45 pozitif hücrelerde CD14 pozitifliği

ile makrofajları kapıladık. Fakat alveolar makrofajlar, hem CD 9 pozitif eozinofiller hem de CD 15 pozitif nötrofiller ile karışım gösteriyordu. Mantıksal kapılama yapılarak CD 45 ve CD 14 parlak AM'ler CD 9/SS ve CD 9/CD15 grafiklerinden çıkarılarak karışimsız eozinofil ve karışimsız nötrofil grafikleri yapıldı ve hesaplamalar bu grafikler üzerinden yapıldı. FCM ve optik mikroskopi karşılaştırıldığında FCM'nin optik mikroskopi ile benzer alveolar makrofaj sayısına ulaştığını belirledik (optik mikroskopide makrofaj oranları: %72.95 (58.16-82.73) / FCM'de makrofaj oranları: %75.20 (53.38-86.25), p: 0.820). Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde Simon Barry CD45 pozitif boyanan hücrelerden CD15, CD23 kullanarak belirlemiş olduğu nötrofil, lenfosit ve eozinofil sayılarını çıkararak alveolar makrofajların sayımını yapmıştı (97). Barry'nin yönteminde daha önce belirttiğimiz nedenlerle yanlış hesaplanabilecek olan nötrofil, lenfosit ve eozinofil sayıları alveolar makrofaj hesaplanmasını olumsuz yönde etkileyeceğinden bizim yöntemimizle, mantıksal kapılama ile, alveolar makrofaj sayımının daha doğru yapılacağını düşünmekteyiz. Tricas ve arkadaşları ise alveolar makrofajların FCM de sayımı için HLA-DR pozitifliği ve CD16 pozitifliği kullanmıştı (90). Diğer taraftan HLA-DR, nötrofiller ve T lenfositler tarafından da eksprese edildiği için alveolar makrofajların sayımında yanlış sonuçlar verebileceği akılda tutulmalıdır.

Kullanmış olduğumuz yöntem, bazofil sayılarını içermemektedir. Bunun nedeni, bu hücrelerin bronkoskopi gerektiren solunum yolu hastalıklarında o kadar seyrek olduğu ve bunların dahil edilmesinin, kullanılacak belirteçlerin sayısını ve karmaşıklığını artıracaktır. Bazofiller BAL'ın rutin olarak uygulanmadığı alerjiye bağlı hastalıklarla ilgilidir. Bu nedenle, bazofil sayılarını FCM de hesaplamamızın başlıca nedenleri, 4 renkli boyamanın sınırlandırılması ve bazofillerin BAL örneklerindeki düşük frekansıdır.

Tricas ve arkadaşları hücre canlılığını ya da erken apoptotik süreçte olan hücreleri belirlemek için 7-AAD kullanmıştı, fakat Barry ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada erken apoptotik ve ölmekte olan hücreleri belirlemek için bir nükleer boya, 7-AAD kullanılmasının BAL lökosit profili için yararı olmadığı gösterilmiştir (97). Ünitimizde rutin olarak kullanılan BAL profili 7-AAD'yi içermiyordu.

Son olarak; bizim çalışmamızın amacı optik mikroskopi ve akım sitometri yöntemleri arasındaki uyumu değerlendirmektir. Yöntem karşılaştırma çalışmalarında uyum değerlendirmek için korelasyon ya da regresyon analizleri kullanılabilir. Diğer taraftan korelasyon derecesi örnekleme sonuçlarının dağılım genişliğine bağlı olup, dağılım genişliği büyük olan örneklerde korelasyon katsayısı daha yüksek iken, dar olan örneklerde daha düşük çıkar. Öyleki iki yöntem zayıf uyuma sahip olduğu halde yüksek korelasyon gösterebilir (104). Hem korelasyon hemde regresyon analizi iki değişken arasındaki lineer ilişkiyi değerlendirildiği için uyum konusunda bu analizlerin yanıltıcı olduğu ifade edilmiştir (104, 105). Bu yüzden çalışmamızda yukardaki bahsedilen teknikler yerine Bland Altman analizini kullandık.

Örneğin A yöntemi, B yöntemi ile elde edilen değerlerin tam 2 katını veriyorsa, iki yöntemin sonuçları arasında tam bir korelasyon bulunurken zayıf bir uyumluluk elde edilecektir. Yöntem karşılaştırma araştırmalarının korelasyon katsayısı ve regresyon analizi ile değerlendirilmesinin uygun olmadığı, çalışmamızda nedenleri ile açıklanmış, bunların yerine Bland ve Altman tarafından geliştirilen yöntemin kullanılmasının gerekliliği vurgulanmıştır.

### **5.1. Çalışmanın Sınırlamaları**

Biz FCM'de hesapladığımız BAL sıvısı lökosit profilini mikroskopide 400 hücre sayımı metodu ile karşılaştırdık. Literatür incelendiğinde BAL sıvısında lökosit popülasyonunun belirlenmesi ve diferansiyel sayımının yapılması için standart yöntem olarak optik mikroskopide 400 hücre sayımı kullanılmaktadır. Fakat çalışmalarda mikroskopik yöntem ile 400 hücre sayımının dışında farklı metotlar da kullanılmıştır. Nicole J. Fernandez ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışmada; BAL sıvısının hücre profili mikroskopik olarak incelenmiş ve klasik metod olan 400 hücre sayımı ile hücre sayısından bağımsız olarak 5 farklı alandan lökosit popülasyonlarının sayımı karşılaştırılmıştır (106). Bu çalışmada standart 400 hücre diferansiyel sayma metodu yerine 5 alan yönteminin daha güvenilir olduğu ifade edilmiştir. Diğer taraftan mikroskopide 400 hücre sayımı yerine 5 farklı alan yönteminin kullanılabilmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Optik mikroskopide sitoplazmasını kaybeden makrofajların lenfosit olarak sayılabilmesi nedeniyle mikroskopide lenfositlerin daha fazla sayılması ve yine T lenfositlerin FCM de CD14 yüzey antijenine sahip olması nedeniyle alveolar makrofaj olarak sayılması lenfositlerin optik mikroskopiye kıyasla FCM’de düşük olarak sayılmasının nedeni olabileceğini düşünüyoruz.

Alveolar makrofajların FCM ile ayırt edilmesinde temel sorun makrofajların otofloresansıdır (OF). OF, herhangi bir spesifik işaretleme olmaksızın meydana gelen ve yüksek konsantrasyonlarda hücre içi moleküller tarafından uyaran hücrelerin doğal floresanı olarak tanımlanır. Çalışmamızda CD9-FITC/CD14-PE grafiğinde alveolar makrofajlar OF nedeniyle eozinofiller karışım göstermekteydi. OF sırasıyla floresan izotiyosiyanat (FITC) veya fitoesterit (PE) yayan 525 veya 575 nanometrede ışık yayan standart floresan boyalar tarafından üretilen floresanı engeller (107). Özellikle sigara içilmesi gibi eksojen etkilerin alveolar makrofajların OF'sini büyük ölçüde arttırdığı göz önünde bulundurulduğunda, otofloresansın BAL sıvısı hücre popülasyonlarının akış sitometrik analizi için ciddi bir zorluk oluşturduğu görülmektedir. OF kaynaklı yanlış hesaplamaların giderilmesi için otofloresansın söndürülmesi gerekmektedir. OF derecesi, daha yüksek uyarım dalga boylarında daha düşüktür ve yayılan ışığın tepe noktası, yaklaşık 540 nm'de gerçekleşir. Bu nedenle, OF'nin negatif etkileri, yüksek dalga boylarında ışık saçan ve / veya ışık yayan floresan boylarının uygulanmasıyla aşılabılır. G. Hallden ve arkadaşlarının 1991 de yaptığı bir çalışmada alveolar makrofajların OF'si kan monosit / makrofajlarından daha fazla bulunmuş ve bunun flavoproteinler, lipofusin veya diğer depolama pigmentlerinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (108). Bu çalışmada kristal viyole, bilinen bir lizozomotorik boya olduğu ve bir otofloresans emisyon spektrumu ile örtüşen bir emilim spektrumuna sahip olduğu için bir söndürme boyası olarak test edilmiştir ve kullanımının OF yi söndürebileceği gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda birçok madde OF'nin söndürülmesi için kullanılmıştır. Tricas ve arkadaşları OF'yi gidermek için allofikosiyenin (APC) boya ile konjuge edilmiş anti-human HLA-DR monoklonal antikoru kullanmışlardır. OF'nin olumsuz etkisini en aza indirmek için fiksasyon ve permeabilizasyon gerektirmeyen bu stratejinin, Hallden ve arkadaşlarının kullanmış olduğu kristal viyole ile söndürmekten daha kolay olduğunu belirtmişlerdir (90). OF'nin giderilmesi FCM’de alveolar makrofajların optimal olarak karışimsız



elde edilmesi için gerekmektedir. Makrofajların otofloresansı, çalışmamızda OF'nin giderilmesi için herhangi bir madde uygulanmadığından, alveolar makrofaj ve diğer lökosit popülasyonlarının yanlış sayılmasına neden olmuş olabilir.

Barret D. Conner ve arkadaşları 2003 yılında plevral sıvıda diferansiyel hücre sayımı ile ilgili yaptığı bir çalışmada nötrofil yüzdesi ve mononükleer / mezotelyal hücre yüzdesi, EDTA ile muamele edilmiş tüplerde daha yüksek olma eğilimindeyken, lenfosit yüzdesi ve eozinofil yüzdesi, EDTA ile muamele edilmiş tüplerde daha düşük olma eğiliminde olduğunu göstermişlerdir (109). Biz BAL sıvısını FCM için filtreden geçirdikten sonra EDTA ile muamele edilmiş tüplerde patoloji laboratuvarına nakledip mikroskop altında 400 hücre sayımını yaptık. Bu yöntem ile mikroskopi altında saymış olduğumuz lökosit popülasyonlarını ve oranlarını etkilemiş olabilir.

Çalışmamızda 4 renkli FCM cihazı kullanmıştık. Daha yüksek renk kapasitesine sahip cihazların kullanımı ile daha kesin ve net sonuçlar alınabilir. Yüksek renk sayısı lökosit alt kümelerinin fenotipik ve fonksiyonel analizini daha fazla işaretleyici kullanarak daha doğru yapmamızı sağlayabilir (110).

Hatzelmann ve arkadaşları 1996 yılında ratlarda BAL sıvısında diferensiyel hücre sayımının otomatik sayımını çalışmışlar ve lökosit membranlarını stabilize eden özellikle eozinofilleri boyayan "Eosinofix" ile stabilizasyon yapmışlardır (111). Bu stabilizasyon ile optik mikroskopi ile direk sayım yöntemi ile otomatik sayım arasında monositler/makrofajlar, lenfositler, nötrofiller ve eozinofiller için yüksek korelasyon gösterilmiştir. FCM öncesinde lökosit membrablarının bozulmasını önleyen bir stabilizatör madde kullanmamız daha doğru sonuçlara ulaşmamızı sağlayabilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

BAL sıvısı lökosit profilinin belirlenmesi için BAL sıvısında mikroskopi ile 400 hücre sayımı FCM'ye kıyasla daha ucuz bir yöntemdir. Fakat bu yöntem zaman alıcıdır ve kişiye bağımlıdır. Çalışmamız BAL sıvısının diferansiyel hücre profili analizinde uygun klinik şartlar ve ulaşılabilirlik durumunda daha hızlı sonuç veren ve alveolar hücre popülasyonunu daha iyi yansıtabilen FCM'nin güvenli olarak kullanabileceğini işaret etmektedir. Diğer taraftan FCM'nin BAL sıvısı lökosit profilinin belirlenmesinde mikroskopi yerine kullanılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

FCM'nin daha güvenilir ve objektif sonuçlar vermesi için bazı teknik detaylara dikkat etmek ve BAL sıvısını bazı işlemlere tabi tutmak gerekmektedir. FCM cihazı renk sayısının yüksek olması daha net sonuçlar sağlayacaktır. Yüksek renk sayısı lökosit alt kümelerinin fenotipik ve fonksiyonel analizini daha fazla işaretleyici kullanarak daha doğru yapılmasını sağlar. Lökosit alt kümelerinin birden fazla ve daha spesifik antikolar kullanarak belirlenmesi karışimsız ve daha doğru sonuçlar sağlar. Alveolar makrofajların otofloresansı sayımda hatalara neden olmaktadır. OF'nin söndürülmesi gerekmektedir. Bunun için diğer hücre popülasyonlarını etkilemeyen OF'nin söndürülmesine spesifik yöntemler geliştirilmeli ve kullanılmalıdır. Lökosit membranlarının bozulması FCM'de kullanılan antikoların hücre yüzeyindeki antijenleri tanımasını engellemektedir. Bu nedenle lökosit membranlarını stabilize edecek maddeler kullanılmalıdır.

## 7. KAYNAKÇA

1. Stitt HL. Bronchial lavage. Bull StLouis Medical Society. 1932;26:246-9.
2. RAMIREZ-R J, SCHULTZ RB, DUTTON RE. Pulmonary alveolar proteinosis: a new technique and rationale for treatment. Archives of Internal Medicine. 1963;112(3):419-31.
3. Reynolds HY, Thompson RE. Pulmonary host defenses: II. Interaction of respiratory antibodies with *Pseudomonas aeruginosa* and alveolar macrophages. The Journal of Immunology. 1973;111(2):369-80.
4. Metzger WJ, Nugent K, Richerson HB, Moseley P, Lakin R, Zavala D, et al. Methods for bronchoalveolar lavage in asthmatic patients following bronchoprovocation and local antigen challenge. Chest. 1985;87(1 Suppl):16s-9s.
5. Baughman RP, Dohn MN, Shipley R, Buchsbaum JA, Frame PT. Increased *Pneumocystis carinii* recovery from the upper lobes in *Pneumocystis pneumonia*. The effect of aerosol pentamidine prophylaxis. Chest. 1993;103(2):426-32.
6. Helmers R, Dayton C, Floerchinger C, Hunninghake G. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease: effect of volume of fluid infused. Journal of Applied Physiology. 1989;67(4):1443-6.
7. Strumpf IJ, Feld MK, Cornelius MJ, Keogh BA, Crystal RG. Safety of fiberoptic bronchoalveolar lavage in evaluation of interstitial lung disease. Chest. 1981;80(3):268-71.
8. Pingleton SK, Harrison GF, Stechschulte DJ, Wesselius LJ, Kerby GR, Ruth WE. Effect of location, pH, and temperature of instillate in bronchoalveolar lavage in normal volunteers. American Review of Respiratory Disease. 1983;128(6):1035-7.
9. Krause A, Hohberg B, Heine F, John M, Burmester GR, Witt C. Cytokines derived from alveolar macrophages induce fever after bronchoscopy and bronchoalveolar lavage. American journal of respiratory and critical care medicine. 1997;155(5):1793-7.
10. Standiford TJ, Kunkel SL, Strieter RM. Elevated serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  after bronchoscopy and bronchoalveolar lavage. Chest. 1991;99(6):1529-30.
11. Huang Y-CT, Bassett MA, Levin D, Montilla T, Ghio AJ. Acute phase reaction in healthy volunteers after bronchoscopy with lavage. Chest. 2006;129(6):1565-9.

12. Robbins RA, Linder J, Stahl MG, Thompson AB, Haire W, Kessinger A, et al. Diffuse alveolar hemorrhage in autologous bone marrow transplant recipients. *The American journal of medicine*. 1989;87(5):511-8.
13. Maygarden SJ, Iacocca MV, Funkhouser WK, Novotny DB. Pulmonary alveolar proteinosis: a spectrum of cytologic, histochemical, and ultrastructural findings in bronchoalveolar lavage fluid. *Diagnostic cytopathology*. 2001;24(6):389-95.
14. Mariotta S, Guidi L, Papale M, Ricci A, Bisetti A. Pulmonary alveolar microlithiasis: review of Italian reports. *European journal of epidemiology*. 1997;13(5):587-90.
15. Fleury-Feith J, Escudier E, Pocholle M, Carre C, Bernaudin J. The effects of cytocentrifugation on differential cell counts in samples obtained by bronchoalveolar lavage. *Acta cytologica*. 1987;31(5):606-10.
16. Reference Leukocyte Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods. NCCLS Document. 1992;VOLUME 12, No.1(Reference Method of the Evaluation of Automated Differential Counters, Based on the Visual Differential Count).
17. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, Du Bois RM, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;185(9):1004-14.
18. Goh NS, Veeraraghavan S, Desai SR, Cramer D, Hansell DM, Denton CP, et al. Bronchoalveolar lavage cellular profiles in patients with systemic sclerosis–associated interstitial lung disease are not predictive of disease progression. *Arthritis & Rheumatism*. 2007;56(6):2005-12.
19. Meyer KC, Rosenthal NS, Soergel P, Peterson K. Neutrophils and low-grade inflammation in the seemingly normal aging human lung. *Mechanisms of ageing and development*. 1998;104(2):169-81.
20. Biosciences B. *Introduction to Flow Cytometry: A learning guide. Manual Part*. 2000;1.
21. Dunphy CH. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2004;128(9):1004-22.

22. Perez-Arellano J, Alcazar-Montero M, Jimenez-Lopez A. Alveolar macrophage: origin, kinetics and relationship with cells of the alveolo-interstitial region. *Allergologia et immunopathologia*. 1990;18(3):175-83.
23. Bowden DH, Adamson IY. The pulmonary interstitial cell as immediate precursor of the alveolar macrophage. *The American journal of pathology*. 1972;68(3):521.
24. Guilliams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *Journal of Experimental Medicine*. 2013;210(10):1977-92.
25. Gwyer Findlay E, Hussell T. Macrophage-mediated inflammation and disease: a focus on the lung. *Mediators of inflammation*. 2012;2012.
26. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Mutlu GM, Budinger GS, Perlman H. Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2013;49(4):503-10.
27. Herold S, Mayer K, Lohmeyer J. Acute lung injury: how macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair. *Frontiers in immunology*. 2011;2:65.
28. Zola H, Swart B, Nicholson I, Voss E. *Leukocyte and stromal cell molecules: the CD markers*: John Wiley & Sons; 2007.
29. Wood E. Cellular and molecular immunology: Abbas AK, and Lichtman, AH. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2004;32(1):65-6.
30. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 2005.
31. Graham RM, Graham RM. *The cytologic diagnosis of cancer*: Saunders; 1963.
32. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews immunology*. 2006;6(3):173.
33. Yoo SK, Starnes TW, Deng Q, Huttenlocher A. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature*. 2011;480(7375):109.
34. Hickey MJ, Kubes P. Intravascular immunity: the host–pathogen encounter in blood vessels. *Nature reviews immunology*. 2009;9(5):364.
35. Jacobs L, Nawrot TS, De Geus B, Meeusen R, Degraeuwe B, Bernard A, et al. Subclinical responses in healthy cyclists briefly exposed to traffic-related air pollution: an intervention study. *Environmental Health*. 2010;9(1):64.

36. Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007;119(6):1303-10.
37. Young B, Woodford P, O'Dowd G. *Wheater's Functional Histology E-Book: A Text and Colour Atlas*: Elsevier Health Sciences; 2013.
38. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clinical & Experimental Allergy*. 2008;38(5):709-50.
39. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annual review of immunology*. 2006;24.
40. European RS, Society AT. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2002;165(2):277.
41. Tabuena RP, Nagai S, Tsutsumi T, Handa T, Minoru T, Mikuniya T, et al. Cell profiles of bronchoalveolar lavage fluid as prognosticators of idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia among Japanese patients. *Respiration*. 2005;72(5):490-8.
42. Kinder BW, Brown KK, Schwarz MI, Ix JH, Kervitsky A, King Jr TE. Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2008;133(1):226-32.
43. Daniil ZD, Gilchrist FC, Nicholson AG, Hansell DM, Harris J, Colby TV, et al. A histologic pattern of nonspecific interstitial pneumonia is associated with a better prognosis than usual interstitial pneumonia in patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;160(3):899-905.
44. Shimizu S, Yoshinouchi T, Ohtsuki Y, Fujita J, Sugiura Y, Banno S, et al. The appearance of S-100 protein-positive dendritic cells and the distribution of lymphocyte subsets in idiopathic nonspecific interstitial pneumonia. *Respiratory medicine*. 2002;96(10):770-6.

45. Cohen AJ, King Jr TE, Downey GP. Rapidly progressive bronchiolitis obliterans with organizing pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1994;149(6):1670-5.
46. Forlani S, Ratta L, Bulgheroni A, Cascina A, Paschetto E, Cervio G, et al. Cytokine profile of broncho-alveolar lavage in BOOP and UIP. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG*. 2002;19(1):47-53.
47. Allen JN, Davis WB, Pacht ER. Diagnostic significance of increased bronchoalveolar lavage fluid eosinophils. *American Review of Respiratory Disease*. 1990;142(3):642-7.
48. Trisolini R, Cancellieri A, Bonaccorsi A, Poletti V. Bronchoalveolar lavage suggesting diffuse alveolar damage in a patient with acute eosinophilic pneumonia. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG*. 2001;18(3):311.
49. Davies G, Wells AU, du Bois RM. Respiratory bronchiolitis associated with interstitial lung disease and desquamative interstitial pneumonia. *Clinics in chest medicine*. 2004;25(4):717-26.
50. Ryu JH, Myers JL, Capizzi SA, Douglas WW, Vassallo R, Decker PA. Desquamative interstitial pneumonia and respiratory bronchiolitis-associated interstitial lung disease. *Chest*. 2005;127(1):178-84.
51. Hamman L, Rich AR. Fulminating diffuse interstitial fibrosis of the lungs. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 1935;51:154.
52. Nagai S, Kitaichi M, Izumi T. Classification and recent advances in idiopathic interstitial pneumonia. *Current opinion in pulmonary medicine*. 1998;4(5):256-60.
53. Nicholson A, Wotherspoon A, Diss T, Hansell D, Bois RD, Sheppard M, et al. Reactive pulmonary lymphoid disorders. *Histopathology*. 1995;26(5):405-12.
54. Yousem SA, Colby TV, Carrington CB. Follicular bronchitis/bronchiolitis. *Human pathology*. 1985;16(7):700-6.
55. Cha S-I, Fessler MB, Cool CD, Schwarz MI, Brown KK. Lymphoid interstitial pneumonia: clinical features, associations, and prognosis. *European Respiratory Journal*. 2006.

56. Hunninghake G, Costabel U, Ando M, Baughman R, Cordier J, Du Bois R, et al. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders. Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG. 1999;16(2):149.
57. Paradis I, Dauber J, Rabin B. Lymphocyte phenotypes in bronchoalveolar lavage and lung tissue in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. The American review of respiratory disease. 1986;133(5):855-60.
58. Bjermer L, Rosenhall L, Angström T, Hällgren R. Predictive value of bronchoalveolar lavage cell analysis in sarcoidosis. Thorax. 1988;43(4):284-8.
59. Welker L, Jörres R, Costabel U, Magnussen H. Predictive value of BAL cell differentials in the diagnosis of interstitial lung diseases. European respiratory journal. 2004;24(6):1000-6.
60. Depierre A, Dalphin J, Pernet D, Dubiez A, Faucompre C, Breton J. Epidemiological study of farmer's lung in five districts of the French Doubs province. Thorax. 1988;43(6):429-35.
61. Hughes D, Haslam P. Effect of smoking on the lipid composition of lung lining fluid and relationship between immunostimulatory lipids, inflammatory cells and foamy macrophages in extrinsic allergic alveolitis. European Respiratory Journal. 1990;3(10):1128-39.
62. Ratjen F, Costabel U, Griese M, Paul K. Bronchoalveolar lavage fluid findings in children with hypersensitivity pneumonitis. European Respiratory Journal. 2003;21(1):144-8.
63. Barrera L, Mendoza F, Zuñiga J, Estrada A, Zamora AC, Melendro EI, et al. Functional diversity of T-cell subpopulations in subacute and chronic hypersensitivity pneumonitis. American journal of respiratory and critical care medicine. 2008;177(1):44-55.
64. Semenzato G, Trentin L, Zambello R, Agostini C, Cipriani A, Marcer G. Different types of cytotoxic lymphocytes recovered from the lungs of patients with hypersensitivity pneumonitis. The American review of respiratory disease. 1988;137(1):70-4.



65. Drent M, van Velzen-Blad H, Diamant M, Wagenaar SS, Donckerwolcke-Bogaert M, van den Bosch JM. Differential diagnostic value of plasma cells in bronchoalveolar lavage fluid. *Chest*. 1993;103(6):1720-4.
66. Haslam PL, Dewar A, Butchers P, Primett ZS, Newman-Taylor A, Turner-Warwick M. Mast cells, atypical lymphocytes, and neutrophils in bronchoalveolar lavage in extrinsic allergic alveolitis: comparison with other interstitial lung diseases. *American Review of Respiratory Disease*. 1987;135(1):35-47.
67. Weinberger SE, Kelman JA, Elson NA, Young RC, Reynolds HY, Fulmer JD, et al. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Annals of internal medicine*. 1978;89(4):459-66.
68. Klech H. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir Rev*. 1992;2(8):47-127.
69. Cullen MR, Kominsky JR, Rossman MD, Cherniack MG, Rankin JA, Balmes JR, et al. Chronic beryllium disease in a precious metal refinery: clinical epidemiologic and immunologic evidence for continuing risk from exposure to low level beryllium fume. *American Review of Respiratory Disease*. 1987;135(1):201-8.
70. Sablonniere B, Scharfman A, Lafitte J, Laine A, Aerts C, Hayem A. Enzymatic activities of bronchoalveolar lavages in coal workers pneumoconiosis. *Lung*. 1983;161(1):219-28.
71. Lusuardi M, Capelli A, Donner C, Capelli O, Velluti G. Semi-quantitative X-ray microanalysis of bronchoalveolar lavage samples from silica-exposed and nonexposed subjects. *European Respiratory Journal*. 1992;5(7):798-803.
72. Wallace JM, Oishi JS, Barbers RG, Batra P, Aberle DR. Bronchoalveolar lavage cell and lymphocyte phenotype profiles in healthy asbestos-exposed shipyard workers. *The American review of respiratory disease*. 1989;139(1):33-8.
73. Forni A. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of hard metal disease. *Science of the total environment*. 1994;150(1-3):69-76.
74. Vassallo R, Ryu JH, Colby TV, Hartman T, Limper AH. Pulmonary Langerhans'-cell histiocytosis. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(26):1969-78.

75. Favara BE, Feller AC, Pauli M, Jaffe ES, Weiss LM, Arico M, et al. Contemporary classification of histiocytic disorders. *Medical and Pediatric Oncology: The Official Journal of SIOP—International Society of Pediatric Oncology (Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique)*. 1997;29(3):157-66.
76. Tazi A, Bonay M, Grandsaigne M, Battesti J-p, Hance AJ, Soler P. Surface phenotype of Langerhans cells and lymphocytes in granulomatous lesions from patients with pulmonary histiocytosis X. *American Review of Respiratory Disease*. 1993;147:1531-.
77. Casolaro MA, Bernaudin J-F, Saltini C, Ferrans VJ, Crystal RG. Accumulation of Langerhans' cells on the epithelial surface of the lower respiratory tract in normal subjects in association with cigarette smoking. *The American review of respiratory disease*. 1988;137(2):406-11.
78. Basset F, Soler P, Jaurand M, Bignon J. Ultrastructural examination of broncho-alveolar lavage for diagnosis of pulmonary histiocytosis X: Preliminary report on 4 cases. *Thorax*. 1977;32(3):303-6.
79. Nogee LM, DeMello DE, Dehner LP, Colten HR. Deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *New England Journal of Medicine*. 1993;328(6):406-10.
80. Seymour JF, Presneill JJ. Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(2):215-35.
81. Holbert JM, Costello P, Li W, Hoffman RM, Rogers RM. CT features of pulmonary alveolar proteinosis. *American Journal of Roentgenology*. 2001;176(5):1287-94.
82. Hook G, Gilmore L, Talley F. Multilamelled structures from the lungs of patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1984;50(6):711-25.
83. Ramirez J, Harlan WR. Pulmonary alveolar proteinosis: nature and origin of alveolar lipid. *The American journal of medicine*. 1968;45(4):502-12.
84. Colby TV, Fukuoka J, Ewaskow SP, Helmers R, Leslie KO. Pathologic approach to pulmonary hemorrhage. *Annals of diagnostic pathology*. 2001;5(5):309-19.

85. Huaringa A, Leyva F, Signes-Costa J, Morice R, Raad I, Darwish A, et al. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of pulmonary complications of bone marrow transplant patients. *Bone marrow transplantation*. 2000;25(9):975.
86. Agusti C, Ramirez J, Picado C, Xaubet A, Carreras E, Ballester E, et al. Diffuse alveolar hemorrhage in allogeneic bone marrow transplantation. A postmortem study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;151(4):1006-10.
87. Epstein CE, Elidemir O, Colasurdo GN, Fan LL. Time course of hemosiderin production by alveolar macrophages in a murine model. *Chest*. 2001;120(6):2013-20.
88. Drew WL, Finley TN, Golde DW. Diagnostic lavage and occult pulmonary hemorrhage in thrombocytopenic immunocompromised patients. *American Review of Respiratory Disease*. 1977;116(2):215-21.
89. Erasmus JJ, McAdams HP, Rossi SE. High-resolution CT of drug-induced lung disease. *Radiologic Clinics*. 2002;40(1):61-72.
90. Tricas L, Echeverría A, Blanco MA, Menéndez M, Belda J. Flow cytometry counting of bronchoalveolar lavage leukocytes with a new profile of monoclonal antibodies combination. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2012;82(2):61-6.
91. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, du Bois RM, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;185(9):1004-14.
92. Berry Schumann G, Linker G. Cytopreparatory techniques for bronchoalveolar lavage specimens. *Laboratory Medicine*. 1992;23(2):115-9.
93. Kaplan R, Morse B, Huebner K, Croce C, Howk R, Ravera M, et al. Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87(18):7000-4.
94. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 2004;117(6):699-711.
95. Brandt B, Thomas M, Von Eiff M, Assmann G. Immunophenotyping of lymphocytes obtained by bronchoalveolar lavage: description of an all-purpose tricolor flow cytometric application. *Journal of immunological methods*. 1996;194(1):95-102.

96. Scrimini S, Pons J, Cosío B, Agusti A, Jahn A, Córdova R, et al. Expression of HLA-DR in circulating polymorphonuclear neutrophils of COPD patients. *Eur Respiratory Soc*; 2013.
97. Barry SM, Condez A, Johnson MA, Janossy G. Determination of bronchoalveolar lavage leukocyte populations by flow cytometry in patients investigated for respiratory disease. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2002;50(6):291-7.
98. Van't Hof W. Use of Stem Cells to Reduce Leukocyte Extravasation. Google Patents; 2011.
99. Kerr MA, Stocks SC. The role of CD15-(Le x)-related carbohydrates in neutrophil adhesion. *The Histochemical journal*. 1992;24(11):811-26.
100. Nakayama F, Nishihara S, Iwasaki H, Kudo T, Okubo R, Kaneko M, et al. CD15 expression in mature granulocytes is determined by  $\alpha$ 1, 3-fucosyltransferase IX (FUT9), but in promyelocytes and monocytes by  $\alpha$ 1, 3-fucosyltransferase IV (FUT4). *Journal of Biological Chemistry*. 2001.
101. Svendsen ER, Yeatts KB, Peden D, Orton S, Alexis NE, Creason J, et al. Circulating neutrophil CD14 expression and the inverse association of ambient particulate matter on lung function in asthmatic children. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2007;99(3):244-53.
102. Sumiyoshi N, Ishitobi H, Miyaki S, Miyado K, Adachi N, Ochi M. The role of tetraspanin CD9 in osteoarthritis using three different mouse models. *Biomedical Research*. 2016;37(5):283-91.
103. Kitchens RL. Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. *CD14 in the Inflammatory Response*. 74: Karger Publishers; 2000. p. 61-82.
104. . Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 2003;56(3).
105. Giavarina D. Understanding bland altman analysis. *Biochemia medica: Biochemia medica*. 2015;25(2):141-51.
106. Fernandez NJ, Hecker KG, Gilroy CV, Warren AL, Léguillette R. Reliability of 400-cell and 5-field leukocyte differential counts for equine bronchoalveolar lavage fluid. *Veterinary clinical pathology*. 2013;42(1):92-8.
107. Garn H. Specific aspects of flow cytometric analysis of cells from the lung. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2006;57:21-4.

108. Hallden G, Sköld C, Eklund A, Forslid J, Hed J. Quenching of intracellular autofluorescence in alveolar macrophages permits analysis of fluorochrome labelled surface antigens by flow cytometry. *Journal of immunological methods*. 1991;142(2):207-14.
109. Conner BD, Lee YG, Branca P, Rogers JT, Rodriguez RM, Light RW. Variations in pleural fluid WBC count and differential counts with different sample containers and different methods. *Chest*. 2003;123(4):1181-7.
110. Roederer M, De Rosa S, Gerstein R, Anderson M, Bigos M, Stovel R, et al. 8 Color, 10-parameter flow cytometry to elucidate complex leukocyte heterogeneity. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 1997;29(4):328-39.
111. Hatzelmann A, Haefner D, Beume R, Schudt C. Automatic leukocyte differentiation in bronchoalveolar lavage fluids of guinea pigs and Brown-Norway rats. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 1996;35(2):91-9.

## 8. EKLER

### EK 1: Etik Kurul Onayı



**T.C.**  
**BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ**  
**Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı**

**TOPLANTI TARİHİ** : 22/11/2017  
**TOPLANTI NO** : 2017/19

**KARARLAR :**

- 6- Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2017-105-22/11 Protokol no'lu "Bronkoalveolar Lavaj Sıvısında Hücre Sayımının Farklı Metotlar Arasında Karşılaştırılması" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verilmiştir.

**A S L I G İ B İ D İ R**

**Prof. Dr. Günül ÖZBAKIŞ DENGİZ**  
**B.E.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı**