

MONOKLONAL ANTİKORLAR VE ALKALEN FOSFATAZ-ANTIALKALEN FOSFATAZ TEKNİĞİ KULLANILARAK AKUT LÖSEMİLERİN İMMÜNOFENOTİPLENDİRİLMESİ

IMMUNOPHENOTYPING RESULTS IN ACUTE LEUKEMIA ACCORDING TO APAAP TECHNIQUE

Salim B. TEKİN, Mehmet GÜNDOĞDU, Hasan KAYA, Güngör AKÇAY, İlhami KİKİ, Halil Zeki TONBUL

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum

Bu çalışma, 11-14 Nisan 1996 tarihinde İstanbul'da yapılan Ulusal Hematoloji Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

Özet

Bu çalışma 24 akut lösemi olgusu üzerinde yapıldı. Akut lösemiler (Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), Akut Miyeloblastik Lösemi (AML)'in teşhisinde, Alkaleen Fosfatase-AntiAlkaleen Fosfatase (APAAP) tekniğine göre yapılan immünofenotiplendirmenin etkinlik ve uygunluğunu belirlemek amacıyla gerçekleştirildi. Olguların 3'ü kadın, 21'i erkek ve yaş ortalaması 25.5 yıl idi. FAB sınıflamasına göre olguların 10'u AML, 14'ü ALL idi. Kemik iliği veya periferde yeterli sayıda blastı olan hastalardan uygun örnekler alınarak lam üzerine kan yaymaları yapıldı. Bu yaymalara, APAAP tekniğine göre immünohistokimyasal boyama uygulandı. Boyalı preparatlar, ışık mikroskopunda okunarak değerlendirildi. İmmünofenotiplendirme panelinde CD3, CD7, CD10, CD11b, CD13, CD14, CD19, CD20, CD33, Glikoforin-A, CD41, ve HLA-DR monoklonal antikörleri bulunuyordu. İmmünofenotiplendirme sonucunda, olguların 4(%28) T hücreli, 9(%65) B hücreli ALL ve 1(%7)'i de Common ALL idi. ALL grubu içerisinde HLA-DR en yüksek pozitiflik oranı gösteren monoklonal antikordu. B hücreli ALL'de CD19 bütün olgularda pozitif idi. AML grubunda 4(%40) M2, 3(%30) M3, 3(%30) M4 idi. Glikoforin-A ve CD41 pozitifliği belirlenmedi yani M6 ve M7 olguları çalışma grubumuz içerisinde bulunmuyordu. M2 olgularımızda CD13, M3'de CD13 ve CD33, M4'de CD14 ve CD11b pozitif idi. M3 olgularımızın 2(%20) de HLA-DR pozitif idi. FAB sınıflaması ile immünofenotiplendirme sonuçları birbiriyle uyumluluk arz ediyordu. Bu çalışma sonucunda, APAAP tekniğine göre yapılan immünofenotiplendirmenin klinikte kolay uygulanır, güvenilir ve çabuk sonuç veren bir yöntem olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Akut Lösemi, APAAP tekniği, İmmünofenotiplendirme

Summary

This study was carried out on 24 acute leukemia cases, in order to determine the effectiveness and conveniency of immunophenotyping performed according to Alkaleen Fosfatase-Anti-Alkaleen Fosfatase (APAAP) technique in the diagnosis of acute leukemia (Acute Lymphoblastic Leukemia(ALL), Acute Myeloblastic Leukemia(AML)). 3 of the cases were female, 21 male and the median age was 25.5. According to FAB classification, 10 of the cases were AML, and 14 ALL. Peripheral smear was performed collecting blood samples from the patients with sufficient number of blasts in bone marrow or blood. Immunocytochemical dying was applied on these smears according to APAAP technique. Stained preperates were evaluated under light microscope. There were CD3, CD7, CD10, CD11b, CD13, CD14, CD19, CD20, CD33, Glikoforin-A, CD41, and HLA-DR monoclonal antibodies on immunophenotyping panel. As a results of immunophenotyping, 4 (%28) of the cases were with T-cell, 9(%65) were B-cell ALL and 1 (%7) were Common ALL. HLA-DR was the monoclonal antibody showing the highest positivity ratio in ALL group. CD19 was positive in all ALL cases with B-cell. In AML group were 4(%40) M2, 3(%30) M3, 3(%30) M4. No positivity of Glikoforin-A and CD41 were determined, that is, there were not any M6 and M7 cases, in our study group. CD13 in M2 cases, CD13 and CD33 in M3 cases, CD14 and CD11b in M4 cases were positive. HLA-DR was positive in 2(%20) of our M3 cases. FAB classification and immunophenotyping results were harmonious to each other. It was concluded that immunophenotyping performed according to APAAP is a reliable and quick-resulting technique that can be applied easily at clinic.

Key words: Acute Leukemia, APAAP technique, İmmünofenotiplendirme

Tablo 1. AML Tanısı Alan Olgularımızın İmmünofenotiplendirme Sonuçları

Vaka no	FAB	CD42	GP-A*	CD3	CD10	CD11b	CD13	CD14	CD19	CD20	CD33	HLA-DR
1	M4	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
2	M3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
3	M3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
4	M2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
5	M4	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
6	M2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
7	M4	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
8	M2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
9	M2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
10	M2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-

Giriş

Akut Lösemi (AL)'li pek çok olguda, lösemi tanısı, hücre ve dokuların morfolojik incelenmesiyle konur. Ancak hastalanan hücrenin kesin olarak kimliğini belirlemek veya rutin olarak kullanılan metodlarla tanınamayan hücreleri tanımak böylece hastalığı teşhis etmek için özel teknikler kullanılır (1). Tedavinin doğru yönde uygulanması için de bunun yapılması gerekir. İlk defa 1982 yılında, The Cancer and Leukemia Group B (CALGB), Akut Miyeloblastik Lösemi (AML)'de monoklonal antikorlarla belirlenen yüzey antijenlerinin ortaya çıkarılması çalışmasını başlattı. Daha sonra bazı miyeloid antijenlerin ekspresyonunun prognozu iyi yada kötü yönde etkileyebileceğini ortaya çıkardılar (2). Bilahare, AML'de lenfositlerle ilgili yüzey antijenlerinin eksprese olduğu ortaya kondu (3). Akut lösemilerin monoklonal antikor kullanılarak yapılan immünofenotiplendirilmesinde birçok metod kullanılmaktadır. Bunlar arasında immün floresan yöntem, flow cytometric yöntem, ve immünohistokimyasal boyama yöntemlerinden immün peroksidad ve Alkalenfosfataz-Anti-Alkalenfosfataz (APAAP) yöntemleridir. APAAP immünoalkalen fosfataz tekniği ile hücre yüzeyindeki antijenleri belirleme metodu ilk defa 1983 yılında tarif edildi (4,5). Bu metodun en önemli özelliği periferik kan

veya kemik iliği yaymalarından direk olarak boyamaya elvermesi ve dolayısıyla lösemilerin immünojenik özelliklerini doğru bir şekilde ortaya koymasındadır. Bu teknik özellikle gerek akut gerekse kronik lösemilerin teşhisinde yeni bir yaklaşım olarak karşımıza çıktı ve bize ayrı bir imkan sundu (6). Gerek immünohistokimyasal, gerekse flow sitometrik yöntemle akut lösemilerin değerlendirilmesinde monoklonal antikor (MoAb)'ların teşhis amacı ile kullanılmasının iki yararı vardır: bunlar (1) AML ile Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)'nin birbirinden ayırılabilmesi, (2) AML'nin antikor reaksiyonları arasındaki ilişkidir. Monoklonal antikorlarla, akut lösemilerin aynı anda her iki hücre neslinden kaynaklanabileceği ortaya kondu (1). Çalışmamızın amacı yeni bir metod olan immünohistokimyasal boyama yöntemlerinden APAAP tekniğini kullanarak özellikle akut lösemilerin (ALL,AML) teşhisini doğru bir şekilde yapmaktır.

Materyal ve Metod

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Hematoloji Bölümü'ne müracaat eden ve ilk defa akut lösemi teşhisi konan olgular üzerinde gerçekleştirildi. Hastalara akut lösemi teşhisi klinik ve laboratuvar

Tablo 2. ALL Tanısı Alan Olgularımızda İmmünofenotiplendirme Sonuçları

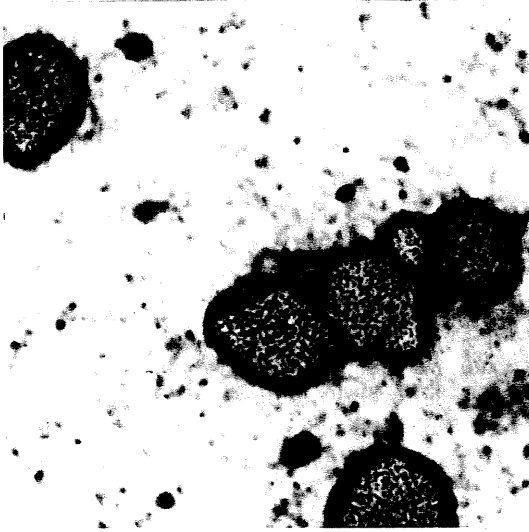
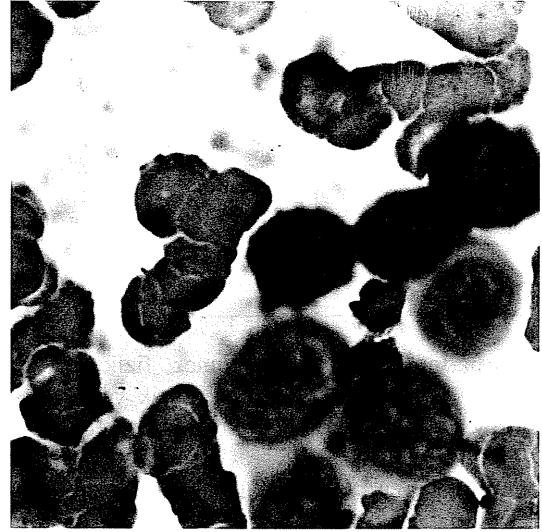
Vaka No	FAB	GP-A	CD 42	CD 3	CD 7	CD10	CD11b	CD13	CD14	CD19	CD20	CD33	HLA-DR
1	L2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
2	L2	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
3	L1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	L1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
5	L2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
6	L2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
7	L2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
8	L2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
9	L1	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
10	L1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
11	L2	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
12	L2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
13	L2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
14	L2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+

bulgularına göre konuldu. Anamnez, fizik muayene bulguları, beyaz küre sayısı, periferik yayma, kan biyokimyası, sedimentasyon ölçümleri, kemik iliği aspirasyonu yanısıra, PAS ve Peroksidad gibi özel boyama metodları da uygulandı. Morfolojik tanı, periferik yayma ve kemik iliği aspirasyonlarında blastik hücrelerin görünümüne göre ve FAB sınıflamasındaki kriterler kullanılarak konuldu. Bu çalışmada toplam 24 olguya immünofenotipleme uygulandı. Öncelikle olguların morfolojik ve sitokimyasal yönden özellikleri belirlendi ve daha sonra toplam 12 antikordan oluşan bir panelde değerlendirildi. Bu antikorlardan CD3 ve CD7 T lenfositleri, CD19, CD20, CD10 (CALLA), HLA-DR B lenfositleri işaretlemekte kullanıldı. CD13, CD14, CD11b ve CD33 miyeloid seriyi işaretlemek amacıyla kullanıldı. AML olgularında M6 için Glikoforin-A, * M7 için ise CD42 antikorları kullanıldı. Boyama için periferik kanda blast sayısı yüksek olan hastalardan periferik yayma, diğerlerinden kemik iliği aspirasyonu alındıktan sonra smearlar hazırlandı. Bu işlemden önce, lamaların üzerine hastanın adı ve soyadı, alındığı tarih ve çalışılacak olan immünojenik marker(CD) yazıldı. İmmünofenotipleme için panelde 11 adet marker kullanıldı. Bunlar: Glikoforin-A, CD42, CD3, CD10 (CALLA), CD11b, CD13, CD14, CD19, CD20, CD33, HLA-DR, Label Alkaline phosphatase conjugated streptavidin, Link, Biotinylated Antimouse Immunoglobulins, Substrate: Naphtol Phosphate In Tris Buffer, Chromogen Fast Red idi. Çalışmamızda kullandığımız ticari KİT'ler (primer antikorlar, link ve label ile hemotoksilen eozin boyası) Biogenex firmasına aitti. Preparatlar derin dondurucu (-30 °C)' de en az 24 saat süreyle saklandı. APAAP tekniğine göre boyama işlemine başlamadan önce, preparatlar derin dondurucudan çıkartıldı. Preparat sıcaklığının oda sıcaklığına gelmesi için bir saat beklendi. Bunun akabinde Dako-pen isimli özel bir kalemle lamın ortasında yaklaşık 1 cm çapında bir daire çizildi. Bunun dışında kalan diğer alanlar temiz bir spançla

temizlendi ve bilahare lamalar, boyama işlemine başlamak için, özel olarak imal edilmiş bir küvetteki ızgaralar üzerine dizildi. Fiberoptik bir maddeden özel olarak imal edilmiş küvetin içerisine, demir ızgara yerleştirildi. Ortamı nemlendirmek amacıyla küvetin içerisine bir miktar çeşme suyu konuldu. APAAP boyama tekniği literatürde bildirildiği şekilde aşağıdaki gibi yapıldı (8, 9). Boyama işleminin ilk basamağında preparatların tesbiti yapıldı. Bu maksatla preparatlar Aseton-Metanol-Formalin (19-19-2) ile 90 saniye süreyle fikse edildi. Preparatlar olduğu gibi çıkartılarak TBS (Tribs Washing solution) içinde (1-5) dakika tutuldu. Bundan sonraki işlem basamağında primer antikor lamdaki işaretli sahanın üzerine bir damla bırakıldı ve 30 dakika süreyle nemli ortamda enkübe edildi. TBS ile tekrar 1-2 dakika yıkandı. Daha sonra LİNK antikordan lamdaki işaretli sahanın üzerine bir damla bırakılarak yine 30 dakika enkübe edildi. Tekrar TBS ile 1-2 dakika yıkandı. Bu işlemden sonra APAAP kompleks (LABEL) ile 30 dakika enkübe edildi ve tekrar TBS ile 1-2 dakika yıkandı. Substrat eklenerek 15-20 dakika enkübe edildi. Preparatlar önce TBS ile sonra musluk suyu ile yıkandı ve 5-7 dakika Hematoksilen ile boyandı. Boyalı preparatlar amonyaklı su içerisinde 5-10 kez çalkalanarak yıkandı ve distile sudan geçirilerek gliser gel ile kapatıldı. Boyama işleminden sonra, preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirildi. Herbir preparatta 100 hücre sayıldı. Preparatlarda sayılan hücrelerin %20 veya daha çoğusu primer antikor ile boyanmış ise bu antikoron pozitif olduğu kabul edildi. Sonuçlar herbir preparat için ayrı ayrı değerlendirilerek kaydedildi.

Sonuçlar

Çalışmamızda APAAP tekniğine göre immünofenotipleme 24 olguya uygulandı.

Şekil 1. Hasta FK. HLA-DR Monoklonal Antikoru ile APAAP Tekniğine Göre Boyama (10×100)**Şekil 2.** Hasta İA, AML (M4), CD14 Monoklonal Antikoru Pozitif (10×100)

Olgularımızın en küçüğü 13, en büyüğü 65 yaşında olup ortalama yaş 25.5 idi. Cinsiyet yönünden 17'i erkek, 3'ü kadın idi. Erkek/Kadın oranı yaklaşık 12/1 idi. AML'li 10 olgudan elde edilen immünohistokimyasal sonuçları Tablo 1'de görülmektedir. FAB sınıflamasına göre AML'li olgularımızın 3(%30)'ü M4, 3(%30) M3, ve 4(%40)'de M2 idi. CD33 olguların hepsinde 10(%100), CD13 8(%80) olguda, CD14 3(%30) olguda, CD11b 3(%30) olguda, HLA-DR 7(%70) olguda pozitif idi. M3 ve M2 olgularımızda CD13 ve CD33 pozitif idi. Bu olguların hepsinde HLA-DR de müsbetti. Ancak, M3 teşhisi koyduğumuz olgulardan birinde HLA-DR menfi idi. M4 tanısı konulan olgulardan üç tanesinde de CD14, CD11b, CD33 ve HLA-DR pozitif idi. M4 olgularından birinde ise CD13 de müsbetti. AML'li hiç bir olgumuzda, ne Glikoforin-A ne de CD42'i pozitif bulduk. AML'li olgularımızdan bir tanesi Kronik Miyeloid Lösemi'nin akut blastik safhasında idi. Sonuçlar dikkatle gözden geçirildiğinde, CD33 ve CD13'ün hemen hemen olguların tamamında müsbet olduğu görülüyor. Dolayısıyla burada miyeloid işaretleyicilerinden en önemlilerinin CD13 ve CD33 olduğu anlaşılıyor. Bu markırların her ikisinde erken miyeloid hücrelerin belirleyicileridir. CD33 ve CD11b tüm olgularda müsbet çıkarken, CD13 yedi olguda müsbet bulundu. İki bir arada değerlendirildiğinde olguların hemen tamamında pozitif sonuç verdi. CD11b için de aynı şeyler söylenebilir. Ayrıca HLA-DR'nin de 8 olgudan 7'sinde pozitif olduğu dikkati çekti. Yani miyelomonositer işaretleyiciler bir tarafa bırakılacak

olursa, en sık pozitiflik bu markırda karşımıza çıktı. M3 olgularımızda ise CD11b, CD13 ve CD33 pozitifliği görüldü. ALL'li Olgular: 4(%28.5) olguda CD3 ve CD7 pozitif idi. CD19 pozitifliğine 11(%78.5) olguda rastlandı. CD20, 4(%28.5) olguda pozitif idi. HLA-DR, iki olgu dışında, diğer olguların tamamında pozitif bulundu (22(%92.8)). HLA-DR'nin negatif bulunduğu olgularda, T hücre markırları (yani CD3 ve CD7) müsbet idi. Olgularımızdan bir tanesinde CD10 (CALLA) müsbetti. Bu olguda, aynı zamanda CD19 ve CD20 de pozitif idi. Burada ALL'leri FAB ile karşılaştırılmadı. Hücrelerin immünohistokimyasal özelliklerini dikkate alarak, değerlendirme yapıldı. Buna göre, olgularımızın 4 ü T-hücreli ALL, ikisi Common ALL, geriye kalan 9 olguda B hücreli ALL olarak değerlendirildi. B-hücreli ALL'lerde en fazla pozitifliği CD19 markırı gösterdi. Bunu CD20 işaretleyicisi takip etmektedir. Ancak, HLA-DR ise 12 olguda pozitif bulunmuştur ki bu da oldukça yüksek bir sayıdır. B-hücreli ALL'lerin hepsinde HLA-DR müsbet çıktı. Bu duruma göre, B-hücreli ALL'lerin en önemli belirleyicileri önem sırasına göre CD19, HLA-DR ve CD20 olmaktadır. T-hücreli ALL'lerde ise CD3 ve CD7 en önemli diagnostik markırlardı. Olgulardan bir tanesinde hem miyeloid hem de lenfoid markırlar ekspresyon almıştır. Bu olguda CD13'ün yanı sıra CD19 ve HLA-DR de pozitif bulundu. Bu olgu muhtemelen bifenotipik lösemi grubunda idi.

Tartışma

AML'de ençok eksprese olan antikorlardan birisi CD33'dür. CD13'de oldukça fazla eksprese olan antikorlardandır. Cancer and Leukemia Group B(CALGB)'nin 196 AML olgusunda yaptığı çalışmada CD33 pozitifliğini %70, CD13 müsbetliğini %57 olarak belirlediler(10). Neame ve ark. (11), 75 AML olgusundan oluşan bir seride, CD33 müsbetliğini %87, CD13 müsbetliğini de %75 olarak bulmuşlardır. Hanson ve ark. (1) 41 AML olgusundan oluşan serilerinde CD33 ve/veya CD13 müsbetliğini %88 olarak bildirdiler. Bizim çalışmamızda, CD33 ve CD13 müsbetliği %100 ve %80 idi. Bu sonuç literatürde bildirilen sonuçlara uygunluk göstermektedir. CD14 ve CD11b monositlerin işaretleyicisi olarak kullanılan antikorlardır. Çalışmamızda, bu antikorlar, FAB'a göre M4 tanısı koyduğumuz olguların tamamında müsbet bulundu. Çalışmamızda, AML'li olgularda, FAB ile APAAP tekniğine göre yapılan immünofenotiplendirme sonuçları karşılaştırıldığında oldukça iyi bir korelasyon olduğu görüldü. Örneğin M2 olgularının tamamında CD13 ve CD33 müsbetliği belirlendi. M3 olgularında pozitif. Aynı sonuçlar M4 olguları için de geçerliydi. Olguların tamamında CD33, CD14 ve CD11b müsbetti. CD14 ve CD11b monositlerin işaretleyicisi olarak kullanılan antikorlardır. Çalışmamızda, bu antikorlar, FAB'a göre M4 tanısı koyduğumuz olguların tamamında müsbet bulundu. Çalışmamızda, AML'li olgularda, FAB ile APAAP tekniğine göre yapılan immünofenotiplendirme sonuçları karşılaştırıldığında oldukça iyi bir korelasyon olduğu görüldü. Örneğin M2 olgularının tamamında CD13 ve CD33 müsbetliği belirlendi. M3 olgularında pozitif. Aynı sonuçlar M4 olguları için de geçerliydi. Olguların tamamında CD33, CD14 ve CD11b müsbetti. Monoklonal antikorlar AML olgularını sınıflandırmak amacıyla kullanılmıştır (12-18). Neame ve ark. (19) yaptığı çalışmada, immünofenotipleme ile FAB sınıflaması arasındaki (75 olgudan oluşan bir vaka serisiydi) ilişkiyi %80'in üzerinde buldular. Aynı ilişkiyi Hanson ve ark.(1) da bulmuşlardır. Akut Promiyelositer Lösemi (M3) olgularında HLA-DR, bir olgu dışında diğerlerinde pozitif idi. Hanson ve ark. (1) yaptığı çalışmada da HLA-DR bir olguda müsbetti. Ancak, APAAP tekniği ile HLA-DR müsbetliği artmaktaydı. Sardaş ve ark.(20), indirekt immünofloresan yöntemini kullanarak , 35 akut lösemi olgusunda yaptıkları immünofenotiplendirmede, AML grubunda bulunan hastalarda, miyelomonositer seri dışında, diğer işaretleyiciler gözden geçirildiğinde, en sık rastlanan antikorun I2(HLA-DR) olduğu tesbit edilmiştir. CALGB grubunun çalışmasında HLA-DR müsbetliği, Akut Promiyelositer Lösemide %27

olarak belirlenmiştir(14). HLA-DR menfiliği Akut Promiyelositer Lösemisinin hipogranüler formlarında görülmektedir(1). Eritroid gelişimin erken evresinin spesifik ve sensitiv markerları belirlenmiştir. R10, ki bu bir antiglikoforin-A antikorudur, bazofilik safhadaki eritroblastlarda bulunur (21). Proeritroblastlar ve miyeloblastlarda reaktivitesine rastlanmaz. R10 (Glikoforin-A), M6 olgularında immatür eritroid seri prekürsörlerini ortaya kor. Transferrin reseptörlerine karşı geliştirilen antikorlar (OKT9), eritrolösemilerde, bütün eritroblastlara ilave olarak, bazı miyeloblastlarda da mevcuttur. Bizim olgularımızın hiçbirinde glikoforin-A müsbetliğine rastlayamadık. Glikoprotein IIB/IIIA veya IIIa'ya karşı geliştirilen monoklonal antikorlar M7 teşhisinde kullanılır (22,23). Megakaryoblastik lösemi olgularının bazılarında anti-FVIII antikorları gözlenebilir. Ancak, Glikoprotein IIB/IIIA'ya karşı geliştirilen monoklonal antikorlar, anti-FVIII antikorlarına göre, megakaryoblastlara karşı çok daha hassastır(1). Olgularımızda, aynen glikoforin-A'da olduğu gibi, CD42'yi de negatif bulduk. Yani M7 olgusuna rastlayamadık. ALL'li olgularımızdan dört tanesinde CD3 ve CD7 müsbet idi. Sekiz olguda ise CD19 müsbettir. HLA-DR ise iki olgu dışında kalan tüm olgularda pozitif idi. CALLA ise bir olguda müsbet bulundu. ALL'lerin %75'i B-hücre lineage'ından kaynaklanır. B-hücre lineage'ında 20 den fazla CD belirlenmiştir(24). CD19, sitoplazmik CD22, CD24, CD10, CD20, yüzey Cd22, sitoplazmik Ig, CD21, yüzeyel Ig ve CD23, B-hücrelerinin gelişimi sırasında sırasıyla ortaya çıkmaktadır(25). CD19 en erken ortaya çıkan bir yüzeyel antigendir ve B-hücreli ALL'lerin %95'den fazlasında mevcuttur (24). Common ALL antigeni (CALLA) olan CD10, stem cell ile ilişkili antijendir. Bu antijenler daha çok çocuklarda ortaya çıkar ve tüm yaş gruplarında iyi prognoz göstergesidir (26). Pre-B hücreleri esas itibarıyla CD10 ve B-hücre yüzey markerlarını eksprese ederler ve Ig gen rearanjmanı gösterirler, ancak yüzey Ig'lerini eksprese etmezler(24). Erişkin ALL'lerin %25'ı T-hücre lineage'ından kaynaklanır. Pre-T hücreli lösemiler hücre yüzeyi CD7 ve sitoplazmik CD3'ü eksprese ederler, ancak T hücre markerları mesela yüzey CD3'ü, CD4 veya CD8 eksprese olmaz (24). CD2 antijeni, önceden koyun eritrosit antijeni olarak bilinirdi. Olgun T-hücrelerinin hepsinde mevcuttur. Esasında CD2, adezyon molekülü olarak vazife görür ve lenfosit fonksiyonları ile alakalı moleküller için bir bağlayıcı olduğuna inanılır (27). Monoklonal antikorlar, ALL'lerin özelliklerini belirlemek amacıyla, bir çok araştırmacı tarafından kullanılmıştır (28-30). Sobol ve ark. (28) 90 erişkin ALL'li olguda immünofloresan yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada en fazla oranda CALLA antijenine (%84) rastlamışlardır. Aynı araştırmacılar

T-hücreli ALL'lerde Ia (HLA-DR) müsbetliğini %42 bulmuşlardır. Çocuklarda ise Ia ekspresyonu daha azdır (29, 31). T-hücre markırlarından en yüksek pozitiflik oranı 3A1 antijeninde tesbit edilmiştir(28). Ia ve BA-2 (p24 antijeni) ALL'lerin her iki tipi (B ve T hücreli ALL) nde de eksprese olmaktadır. Buna karşılık, sınıflandırılmayan grupta bu antijenler negatif bulunmuştur. Bu bulgulara dayanılarak, Ia ve BA-2'nin diferansiyasyon antijenleri olduğu kanaatine ulaşılmıştır (28). Erber ve ark. (6), APAAP tekniğini kullanarak 149 akut lösemi olgusunda yaptıkları immünofenotiplendirme neticesinde c-ALL'ye %57, B ALL'ye %1, T ALL'ye %13 olguda rastlanmıştır. c-ALL'lerde enfazla eksprese olan antijen HLA-DR dir (%100). HLA-DR, aynı zamanda B-ALL'lerin %100'nde pozitifliği. T-hücreli ALL'lerin ise %8'de pozitif bulundu. Bizim çalışmamızın sonuçları da bununla uygun bulundu. Pan B antijeni olan CD22, c-ALL'lerde, B-ALL'lerde yüksek pozitiflik oranı gösterir. Buna karşılık T-ALL'lerde ise negatif bulunan bir markırdır. Çalışmamıza bu antikorlu dahil etmedik. CALLA antijeni Erber ve ark.(6) çalışmasında, c-ALL olgularının %100'de, T-ALL'lerin %8 müsbet olarak tesbit edilmiş, T-Hücreli ALL'lerde ise negatif bulunmuştu. Çalışmamızda ise c-ALL olgularının hepsinde CALLA pozitif iken, T ve B hücreli ALL'lerde negatif idi. Görüldüğü gibi T-hücreli ALL'lerde elde edilen sonuç literatürde bildirilen sonuçlara benzememektedir. Bu durum çalışmanın farklı hasta popülasyonu ve farklı sayıdaki hasta üzerinde yapılmış olmasından kaynaklanabilir. CD19 antijeni, B-hücreli ALL'lerin hepsinde müsbet bulundu. Bu antijen de bir pan B antijenidir. Bu, beklenen bir sonuçtu. Pre-T hücreli lösemilerde eksprese olan yüzey markerları CD7 ve sitoplazmik CD3 dür. Diğer T-hücre markerları örneğin CD3, CD4 veya CD8 eksprese olmazlar. Kullanılan monoklonal antikorlar içerisinde sitoplazmik CD3, CD4 ve CD8 yoktu. Bu nedenle T-hücreli ALL'leri pre-T ve T-hücreli ALL şeklinde ayırd edemedik. Aynı durum B-hücreli lösemiler için de söz konusu oldu. Elimizde erken pre-B ve pre-B hücreli ALL'leri ayırd edebilecek marker yoktu. Bu nedenlerle, APAAP tekniği ile bu lösemileri ortaya çıkarma imkanından mahrumduk. T-hücre markırlarından CD3 ve CD7'yi kullandık. Olgularımızın hepsinde de bu markırlar pozitif bulundu. CD7 bir pan-T hücre markırdır. CD3 ile birlikte olgularımızın %100'de pozitif idi. Bu sonuçlarımız literatürde bildirilen sonuçlara uygunluk göstermektedir (6). Bu çalışma sonucunda, APAAP tekniğine göre yapılan immünofenotiplendirmenin klinikte kolay uygulanır, güvenilir ve çabuk sonuç veren bir yöntem olduğu kanaatine varıldı.

Kaynaklar

1. Hanson CA, Gajl-Peczalska KJ, Parkin JL, et al: Immunophenotyping of acute myeloid leukemia using monoclonal antibodies and the alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase technique. *Blood* 70(1):83-89, 1987.
2. Griffin JD, Davis R, Nelson DA, et al.: Use of surface marker analysis to predict outcome of adult myeloblastic leukemia. *Blood* 68:1232, 1986.
3. Ball ED, Griffin JD, Davis R, Davey FR, et al.: Prognostic value of lymphocyte surface markers in acute myeloid leukemia (AML): A cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood* 72: 187a, 1988 (abstr, suppl).
4. Cordel JL, Falini B, Erber WN, et al: Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immüno complexes of alkaline phosphatase and monoclonal antialkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984; 32:219-29.
5. Erber WN, Falini B, Ghosh AK, Moir DJ, Mason DY: Immünoalkaline phosphatase labelling of hematological samples with monoclonal antibodies. In Feldmann G (ed). *Proceedings of the 2nd International Symposium on Immunoenzymatic Techniques*. Amsterdam:Elsevier/North Holland, 1983; 29-40.
6. Erber WN, Mynheer LC, Mason DY: APAAP labeling of blood and bone marrow samples for phenotyping leukemia. *The Lancet* 1986(5); 761-765.
7. Browman GP, Neame PB, Soamboonsrup P: The contribution of cytochemistry and immunophenotyping to the reproducibility of the FAB classification in acute leukemia. *Blood* 68:900, 1986.
8. Erber WN, Pinching AJ, Mason DY: Immunocytochemical detection of T and B cell populations in routine blood smears. *Lancet* 1984; 1:1042-46.
9. Moir DJ, Ghosh AK, Abdulaziz Z, et al: Immunoenzymatic staining of haematological samples with monoclonal antibodies. *Br J Haematol* 1983;55:395-410.
10. Griffin JD, Davis R, Nelson DA, et al: Use of surface marker analysis to predict outcome of adult acute myeloblastic leukemia. *Blood* 68:1232, 1986.
11. Neame PB, Soamboonsrup P, Browman GP, et al: Classifying acute leukemia by immunophenotyping: A combined FAB-immünologic classification of AML. *Blood* 68: 1355, 1986.
12. Griffin JD, Mayer RJ, Weinstein HJ, et al: Surface marker analysis of acute myeloblastic

- leukemia:identification of diferantation-associated phenotypes. Blood 62:557, 1983.
13. Van der Reijden HJ, Von Rhenen OJ, Lansdorp PM, et al: A comparison of surface marker analysis and FAB classification in acute myeloid leukemia. Blood 61: 443, 1983.
 14. Griffin JD, Davis R, Nelson DA, et al: Use of surface marker analysis to predict outcome of adult acute myeloblastic leukemia. Blood 68: 1232, 1986.
 15. Pessano S, Palumbo A, Ferrero D, et al: Subpopulation heterogeneity in human acute myeloid leukemia determined by monoclonal antibodies. Blood 64:275, 1984.
 16. Matutes E, Rodriguez B, Polli N, et al: Characterization of myeloid leukemias with monoclonal antibodies 3C5 and My9. Hematol Oncol 3: 179, 1985.
 17. Ball ED, Fanger MW: The expression of myeloid-specific antigens on myeloid leukemia cells: correlation with leukemia subclasses and implications for normal myeloid differentiation. Blood 61: 456, 1983.
 18. Tatsumi E, Sagawa K, Mirro J, et al: Immunologic membrane phenotypes in human myeloid leukemia by monoclonal antibodies. Cancer Res 22: 181, 1981.
 19. Neame PB, Soamboonsrup P, Browman GP, et al: Classifying acute leukemia by immunophenotyping: A combined FAB-immunologic classification of AML. Blood 68: 1355, 1986.
 20. Sardaş OS, Akan H, Beksaç M, et al: Akut lösemilerde immünofenotiplendirme. Ankara Üniv Tıp Fak Mecmuası 1990;43(4):915-924.
 21. Greaves MF, Sieff C, Edwards PAW: Monoclonal antiglycophorin as a probe for erythroleukemias. Blood 61:645, 1983.
 22. Huang M, Li CY, Nichols WL, et al: Acute leukemia with megacaryocytic differentiation: A study of 12 cases identified immunocytochemically. Blood 64:427, 1984.
 23. Neumann MP, DeSolas I, Parkin JL, et al: Monoclonal antibody study of philadelphia chromosome-positive blastic leukemias using the alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase (APAAP) technique. Am J Clin Pathol 85:564, 1986.
 24. Pui C-H, Bohm FG, Crist WM: Clinical and biological relevance of immunological marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 82:343, 1993.
 25. Copelan EA, Mcguire EA: The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults (review). Blood, 85(5):1151-1165, 1995.
 26. Lukens JN: Classification and differentiation of the acute leukemias. In Lee ER, Bithell TC, Foerster J (eds), Wintrobe's Clinical Hematology. Ninth edition. 1993, pp:1873-1891.
 27. Ball ED, Davis RB, Griffin JD, et al.: Prognostic value of lymphocyte surface markers in acute myeloid leukemia. Blood 77(10), 1991, 2242-2250.
 28. Sobol RE, Royston I, LeBien TW, et al.: Adult acute lymphoblastic leukemia phenotypes defined by monoclonal antibodies. Blood, 65(3):730-735, 1985.
 29. Link M, Warnke R, Finlay J, et al: A single monoclonal antibody identifies T-cell lineage of childhood lymphoid malignancies. Blood 62: 722, 1983.
 30. Kersey J, Abramson C, Perry G, et al: Clinical usefulness of monoclonal antibody phenotyping in childhood acute lymphoblastic leukemia. Lancet 2:1419, 1982.
 31. Janossy G, Bollum FJ, Bradstock KE, et al: Cellular phenotypes of normal and leukemic hemopoietic cells determined by analysis with selected antibody combinations. Blood 56: 430, 1980.

Yazışma Adresi:

Yrd.Doç.Dr.Salin Başol TEKİN

Araştırma Hastanesi

İç Hastalıkları Kliniği

Erzurum, Tel: 2331122