

BIYOKİMYASAL VE SİTOKİMYASAL LÖKOSİT ALKALEN FOSFATAZ AKTİVİTESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Uz. Ebubekir Bakan (x)
Dr. M. Münip Yeğin (xx)
Dr. Hüseyin T. Sessiz (xxx)
Ar. Gör. Nuri Bakan (xxxx)

ÖZET:

Toplam 150 kişinin (85 kadın, 70 erkek) venöz kanından izole edilen lökositlerde alkalen fosfataz enziminin aktivite düzeyleri kantitatif (biyokimyasal) ve semikantitatif (sitokimyasal) olarak belirlendi. Olgular uygun yaş grubuna, ayrılarak aktivite düzeyleri buna göre değerlendirildi. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı ve aralarında pozitif bir korelasyonun olduğu görüldü. Cinsiyete göre sonuçlar bir özellik arz etmedi.

GİRİŞ:

Alkalen fosfataz (EC 3.1.3.1. ALP) hemen her dokuda (1) yaygın olarak bulunan bir enzimdir. Lenfosit ve monosit gibi mononükleer lökositlerin sitoplazmik membranında ALP bulunursa da (2) bu enzimi deneysel olarak ölçülebilecek miktarlarda içeren kan hücreleri polimorfonükleer (PMN) lökositler (nötrofiller) dir (3,4).

ALP hücrede ısı veren (yıkım) reaksiyonlarını katalizler (5). Optimum pH sı 10 civarındadır ve aktivatörü $Mg+2$ iyonlarıdır (6). Fizyolojik substratı kesin olarak bilinmemesine rağmen fizyolojik olmayan birçok substratı vardır (7). Enzim, aktivitesini sitoplazmada göstermektedir (8). Ancak nörofil içerisinde mikrozomal zar yapılarına bağlı olduğu (9) veya "fosfazom" denen bir tip granül de yerleştiği (10,11) son zamanlarda yapılan çalışmalardan anlaşılmıştır. Enzimin

(x) Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanı.

(xx) Tıp Fak. Biyokimya Anabilim dalı Prof. kürsü başkanı.

(xxx) Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Doçenti.

(xxxx) Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma görevlisi.

hücredeki fonksiyonu kesin olarak bilinmiyor (12,13). Ancak ALP in nükleozit fosfatları, siklik adenosin monofosfatı, histon fosfatı, glukoz-6-fosfatı ve inorganik pirofosfatı hidroliz etmediği değişik araştırmacılar (11,14,15) tarafından belirtilmiştir. Diğer taraftan, enzimin fagositozla ilgili olabileceği (16) sanılmaktadır. Nötrofil ALP aktivite seviyelerinin bir çok hastalıkta normalden sapma gösterdiği (17) bilinmektedir.

Bu çalışma ile aynı zamanda bölgemiz için sitokimyasal ve biyokimyasal lökosit ALP (cLAP ve bLAP) enziminin normal değerleri belirlenmiş olmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hiçbir klinik şikayeti ve bulgusu olmayan 156 sağlıklı kişiden (86 K, 70 E) alınan venöz kanda lökosit sayımı, yayma (Wright boyaması) ve cLAP aktivite tayini yapıldı. Aynı kandan izole edilen nötrofillerde bLAP düzeyleri belirlendi.

1- Kandan Nötrofillerin Ayrılması

Lökosit izolasyonu için plastik malzemeler (enjektör, pipet, tüp) kullanıldı (18). Dekstran sedimentasyon yöntemi ile (19) nötrofiller total kandan ayrıldı. Plastik enjektöre 10 ml heparinize (20-30 U/ml kan olacak şekilde) kan alındı. Bundan lökosit sayımı ve Wright boyaması ile cLAP tayini için yayma yapıldıktan sonra % 6 lik dekstrandan (Eczacıbaşı 75 000), dekstran: kan= 1:2 olacak şekilde, enjektöre çekildi. Yavaşça altüstü edildikten sonra, enjektör ters konumda olmak üzere konularak, oda sıcaklığında 30-90 dak. bekletildi. Eritrositlerin yeteri kadar çöktüğü kanısına varılınca üstteki lökositce zengin kısım, çengel biçimine getirilmiş bir iğne yardımıyla plastik bir tüpe aktarıldı. Üzerine 3-4 ml ilk yıkama çözeltisi (1 gr etilendiamin tetraasetik asit + 0,85 gr sodyum klorür/100 ml) eklendi, karıştırıldı ve santrifüj (160 g. 10 dak) edildi. Yıkama çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra bu işlem fizyolojik tuzlu su (% 0.9 luk NaCl) ile iki defa daha tekrarlandı. Elde edilen lökosit tableti az miktarda da olsa eritrosit içerdiğinden bunlar ozmotik şokla uzaklaştırıldı (18). Bunun için lökosit tableti üzerine 2 ml soğuk redistile su eklendi ve hemen kronometreye basıldı , altüstü edildi ve 20 sn dolunca üzerine 2 ml % 1,8 lik NaCl eklendi, santrifüj edilerek üst kısım uzaklaştırıldı. Lökosit paketi üzerine 1 ml kadar serum fizyolojik eklendi, süspanse edilerek lökosit sayıldı ve % PMN tesbit edildi. Süspansiyon $5-8 \times 10^8$ PMN/ml olacak şekilde sulandırıldı.

2- Lökosit Homojenizatının Hazırlanması

Hazırlanan lökosit süspansiyonundan 1 ml alınarak içerisinde 8 ml soğuk redistile su bulunan bi tüpe aktarıldı. Hızlıca çalkalandı (vortex'de 1 dak), aseton-buz karışımında donduruldu. 37°C de çözüldü (20). Dondurup çözme işlemi tek-

rarlandı. Zar yapılarına bağlı ALP enzimini çözmek için 1 ml saponin (% 2) eklendi (7). Hazırlanan 10 ml hacmindeki bu homojenizat 0°C da 30 dak bekletildi ve bLAP aktivite tayini için kullanıldı.

3- bLAP Aktivitesi Tayini

DeChatelet ve Cooper (21)'ın yöntemi modifiye edilerek enzim eaktivite düzeyleri belirlendi. İki tüpten her birine 1 ml substrat çözeltisi (4 mmol p-nitrofenilfosfat (PNPP) (Sigma) / litre ve 0,5 mmol Mg^{+2} /litre, 0,84 M 2-Metil-2-Amino-1-Propanol (MAP) (Sigma) içinde, pH = 10.2-10,4) konularak 37°C de 5 dak bekletildi. Tüpün birine homojenizattan 0,5 ml eklendi. karıştırıldı, aynı sıcaklıkta 60 dak inkübe edildi. Sürenin bitiminde 10 ml NaOH (0,05 M) eklendi (reaksiyonu durdurmak için). İkinci tüpe de NaOH konduktan sonra 0,5 ml homojenizat eklendi. 420 nm'de optik dansiteler okundu (Coleman Junior II (Mod. 60/2) spektrofotometrede). İki optik dansite arasındaki fark bulundu. Daha önce hazırlanan p-nitrofenol (PNP) standart eğrisinden bu optik dansiteye karşılık gelen enzim aktivitesi U/litre (= μ mol PNP/dak/litre) olarak belirlendi. Bu değer mmol PNP/ 10^{10} PMN/saat birimine çevrildi.

4- cLAP Tayini

Kaplow (22)'un kullandığı yöntemle yapıldı. Ancak deney koşullarına göre bazı noktalar değiştirildi. Heparinize kandan ince bir lam üzerine yayılan kan havada kurutuldu. Sıcaklığı 0°C civarında olan fiksatif çözeltisine (10 ml formalin + 90 ml saf metanol) 30 sn süreyle daldırıldı. İçinde su bulunan bir behere 5-10 defa daldırılıp çıkarılarak yıkandı. Lam, tabanı düz bir yere konduktan sonra üzerine kaplayacak şekilde substrat karışımı (35 mg alfa-naftil asit fosfat sodyum tuzu ve 35 mg fast blue RR, 35 ml MAP (0,05 M, pH=9,75) tamponu içerisinde) döküldü ve 10 dak. bekletildi. Sürenin bitiminde suyla yukarıdaki gibi tekrar yıkandı. Temizlenen lam üzerine hemotoksilin çözeltisi (A/B= 1/120 oranında: A çözeltisi: 1 gr hematein 50 ml etanolde; B çözeltisi: 50 gr potasyum alüminyum sulfat 1 lt distile suda) kaplayacak şekilde döküldü ve 3-4 dak. bekletildi. Sonra yine yukarıdaki gibi suyla yıkandı. Preparatlar havada kurutuldu.

Hazırlanan bu preparatlarda, ışık mikroskobu yardımıyla, 200 nötrofil gözden geçirildi. Hücrelerin boyanma derecelerine göre enzim aktivitesi şöyle değerlendirildi. Sitoplazmasında hiç boyanma olmayanlar (0), hafif boyanma olanlar (+1), sitoplazmanın tamamını kaplamış açık yeşil bir boyanma (+2), bu yaygın boyanma biraz daha koyu ise (+3) ve çok koyu bir boyanma (+4) olarak değerlendirildi. Sonuçlar U/100 PMN olarak belirlendi. cLAP tayininde hataları minimuma indirmek için deneyler paralel çalışıldı ve gebelik kanı ile deney ve reaktifleri kontrol edildi. Çünkü gebelikte periferdeki bütün PMN lökositler (+3) veya (+4) derecede LAP aktivitesi göstermektedir (23).

Çalışmamızda kullandığımız kimyasal maddeler (PNPP, PNP, MAP, fast blue RR, alfa naftil asit fosfat sodum tuzu, hematein) analitik saflıkta idi ve "Sigma Chemical Co." dan sağlandı.

BULGULAR

Olgularımızın tamamını oluşturan 156 sağlıklı kişi aşağıdaki gibi yaş gruplarına ayrıldı.

<u>Yas gurubu (yg)</u>	<u>yaş aralığı</u>	<u>sayısı</u>
1.yg	0—15	39
2.yg	16—30	31
3.yg	31—44	94
4.yg	45 ≤	37

Genel toplam, cinsiyet ve yaş grupları için bulgularımızın ortalama değer ve standart sapmaları tablo-I ve II de verildi.

Bulgularımızın istatistiki analiz sonuçlarından cLAP-bLAP arasında genel toplam, cinsiyet ve yaş grupları için pozitif bir korelasyonun olduğu belirlendi. Bunlardan sadece genel toplama ait korelasyon eğrisi ($r = 0,515$ $P < 0,001$) şekil. I de verildi.

Değişik iki grubun aynı parametresi karşılaştırıldı (t- testi). İkinci yaş grubunda, cLAP ve bLAP aktivite düzeylerinin diğer yaş gruplarına göre daha düşük olduğu görüldü. Ancak istatistiki açıdan nisbeten önemli fark ($P < 0,01$) cLAP değerlerinde olduğu belirlendi.

TARTIŞMA

Lökositçi ALP emziminin hastalıklarda normalden sapma gösterdiği bilinmektedir. Bu da LAP enzimine çeşitli araştırmacıların dikkatini çekmiştir.

Enzimin aktivite düzeyleri bazı myeloid metaplaziler (24), myelom ve hipoplastik anemi (25), enfeksiyon ve lökositoz (26), polisitemia vera (27), lökomoid reaksiyonlar (28), multiple myelom (23), bazı ateşli hastalıklar (29), diyabet (30), agnojenik myeloid metaplazi (31) ve mongolizmde (32) yükselmektedir. Diğer taraftan, kronik granulositik lösemi (33), paroksizmal nokturnal hemoglobinüri (34), hipofosfatazi (35), lökopeni (36), sekonder polisitemi (25), Down's sendromu (36) ve raşitizmde (37) ise LAP aktivite seviyeleri düşmektedir.

Bu enzimin aktivitesini belirlemek için araştırmacılar sitokimyasal ve biyokimyasal yöntemleri kullanmışlardır. LAP aktivitesinin sito-kimyasal olarak tayini kısa zaman alır ve kolaydır. Bu bakımdan klinik laboratuvarlarında rutin olarak yapılmaktadır. Preparat incelenirken hangi yaştaki nötrofilin ne seviyede bir akti-

vite gösterdiği kolayca gözlenebilir. Sitokimyasal elektron mikroskopik çalışmalar (38) enzimin nötrofil içindeki lökalisasyonu ve fonksiyonu hakkında daha doyurucu bilgi vermektedir. Ancak her şeye rağmen cLAP tayini semikantitatifdir ve kişiden kişiye değerlendirmede pozitif veya negatif hatalar yapılabilir (39).

Buna karşılık bLAP aktivite tayini daha zor ve uzun zaman alıcı olmasına rağmen güvenilir sonuca götürür.

Kantitatif LAP aktivitesi ile ilgili olarak elde ettiğimiz sonuçlar Wiltshaw et. al., Valehtina et. al., Tanaka et. al., Rosner et. al., Fehr et. al. ve Sato et. al. nin bulguları ile uygunluk göstermektedir. cLAP değerleri ise Trubowitz et. al., Kemp et. al., Patterson, et. al., Brook et. al. ve Bondue et. al. nin elde ettikleri sonuçlarla uygunluk içindedir.

cLAP ile bLAP arasında pozitif bir korelasyonun bulunması her iki metodun da birbirini desteklediğini gösteriyor. Böyle bir ilgi değişik araştırmacılar (24, 40-42) tarafından da belirlenmiştir.

İkinci yaş grubunda diğerlerine göre daha düşük bir cLAP düzeyinin bulunması PMN lökositlerin kemik iliğinden mobilizasyonu ile ilgili olabilir. Gerçekte periferik kanda yaşlı nötrofillerin sayısı arttıkça cLAP seviyelerinin artmasını beklemek gerektiği (19,39) belirtilmiştir.

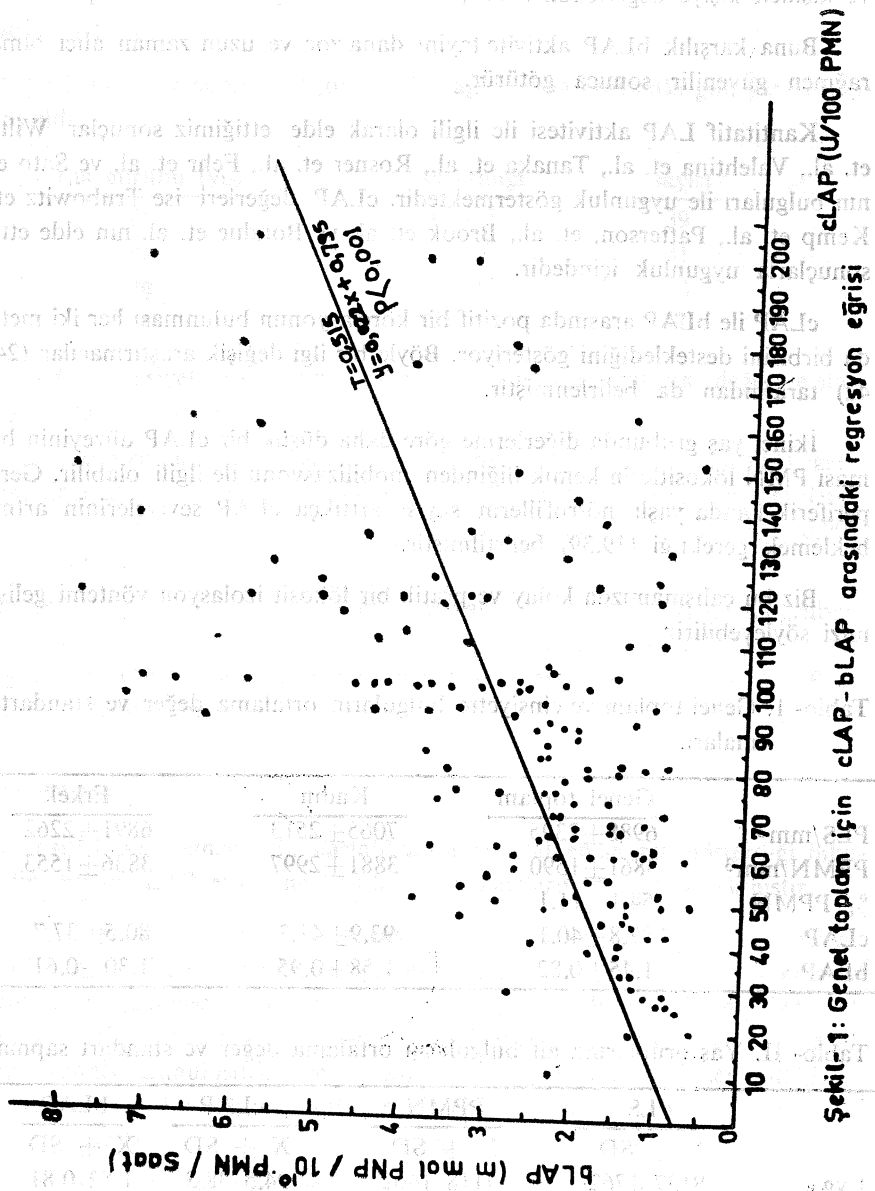
Biz bu çalışmamızda kolay ve pratik bir lökosit izolasyon yöntemi geliştirdimizi söyleyebiliriz.

Tablo- 1. Genel toplam ve cinsiyette bulguların ortalama değer ve standart sapmaları.

	Genel toplam	Kadın	Erkek
PLS/mm ³	6988±2395	7065±2513	6891±2262
PPMN/mm ³	3861±1590	3881±2997	3836±1553
% PPMN	54,1±11,1	—	—
cLAP	87,8±40,1	93,9±41,3	80,5±37,7
bLAP	1,45±0,82	1,58±0,95	1,30±0,61

Tablo- II. Yaş gruplarına ait bulguların ortalama değer ve standart sapmaları

	PLS	PPMN	cLAP	bLAP
	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD
1.yg	8137 1762	4118 1462	94,5 38,3	1,52 0,81
2.yg	6868 1468	3923 982	68,8 28,6	1,37 0,77
3.yg	7084 2997	3963 1875	89,8 45,9	1,50 0,97
4.yg	6037 2122	3405 1683	97,3 38,4	1,40 0,66



THE COMPARISON OF BIOCHEMICAL AND CYTOCHEMICAL DETERMINATION OF LEUKOCYTE ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY LEVELS

SUMMARY

In 150 healthy subjects, leukocyte alkaline phosphatase activity levels were determined by quantitative (biochemical) and semiquantitative (cytochemical) methods. The enzyme activities measured were evaluated in age-grouped subjects. The biochemical and cytochemical results were correlated, and it was found that there was a significant correlation between them. In age group selected, the activity levels had no specificity.

KAYNAKLAR:

1. Tietz, N. W. (derleyen), Fundamentals of Clinical Biochemistry, London, WB. Saunders Co., 1976 s. 610.
2. Krammers, M.T.C., Catowsky, D., Eoa, R, Cell membrane enzyme II, alkaline phosphatase analkaline phosphodiesterase I in leukaemic lymphocytes, Br. J. Haematol, 40: 111-118, 1978.
3. Rej, R., Effect of incubation with Mg^{+2} on the measurement of alkaline phosphatase activity, Clin. Chem. 23 (10): 1903-1911, 1977.
4. Valentine, W. N., Follete, J. H., Solomon, D. H. et. al., The relationship of leukocyte alkaline phosphatase to "stress", to ACTH, and to Adrenal 17-corticosteroids, J. Lab. Clin. Med. 49 (5): 723-737, 1975.
5. Guibant, G. G., Enzymatic Methods of Analysis, Oxford, Pergamon Press Inc. 1970 s. 71.
6. Rausch, P. G., Moore T. G., Granule enzymes polymorphonuclear neutrophils a phylogenetic comparison, Blood 49: 913-919, 1975.
7. Dixon, W. B., Webb, E. C., Enzymes, New York Academic Press, 1964 s. 223.
8. Kaplan N., Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry applications and methods, Ann. NY Acad. Sci. 155: 911-947, 1968.
9. Rusting, G. J. S., Wilson, P. D., Peters, T. J., Studies on subcellular Localization of human neutrophil alkaline phosphatase, J. Cell Sci. 26: 401-412 1979.
10. Rustin, G. J. S., Peters, T. J., Studies of subcellular organelles of neutrophils in chronic granulocytic leukaemia with special reference to alkaline phosphatase, Br. J. Haematol. 41: 533-543 1979.

11. Wilson, P. D., Rustin, G. J. S., Smith, G. P., et. al., Electronic microscopic cytochemical localization of nucleoside phosphatases in normal and chronic granulocytic leukaemic human neutrophils, *Histochem. J.* 13: 73-84, 1981.
12. Sato, N., Mori, M., Oshimura, M. et. al., Factor (b) responsible for the increases in alkaline phosphatase activity of postmitotic granulocyte from human individuals and with chronic myeloid leukemia, *Blood* 59 (1): 141-147, 1982.
13. Bakan, E., Lökosit alkalen fosfataz seviyeleri ve serum alkalen fosfatazi ile ilgisinin araştırılması, Atatürk Üniv. Tıp Fak. Uzmanlık tezi, 1983.
14. Smith, G. R.) Peters, T. J., Subcellular localization and properties of pyridoxal phosphate phosphatases of human polymorphonuclear leukocytes and their relationship to acid and alkaline phosphatase, *Biochim. Biophys. Acta* 661: 287-294, 1981.
15. Smith, G. P., Peters, T. J., Subcellular localization and properties of adenosine disphosphatase activity in human polymorphonuclear leukocytes, *Biochim. Biophys. Acta* 673: 234-242, 1981.
16. Ten Cate, A. R., Syrbu, S., A relationship between alkaline phosphatase activity and the phagocytosis and degradation of collagen by the fibroblast, *J. Anat.* 117: 351-359 1974.
17. Patterson, R. B., Hayes, D. M., Spurr, C. L., Studies of leukocyte alkaline phosphatase activity in various diseases, *Southern. J. Med.* 96: 1026-1029, 1963.
18. Carlson, G. P., Kaneco, J. J., Isolation of leukocytes from bovine peripheral blood, *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 142 (3): 853-856, 1973.
19. Boundue, H., Machin, D., Stryckmans, P. A., The leukocyte alkaline phosphatase in mature neutrophils of different ages, *Scand. J. Haemat.* 24(1): 51-56, 1980.
20. Rosner, F., Lee, S. L., Endocrine relationship of alkaline phosphatase, *Blood* 25 (3): 356-369, 1965.
21. DeChatelet, L. R., Cooper, M. R., A modified procedure for the determination of leukocyte alkaline phosphatase, *Biochem. Med.* 4: 66-68, 1970.
22. Kaplow, L. S., A histochemical procedure for localizing and evaluating alkaline phosphatase in smear and marrow, *Blood* 10 TL. 1023-1027, 1955.
23. Brook, J., Dreisbach, P. B., Leukocyte alkaline phosphatase in multiple myeloma, *J. Lab. Clin. Med.* 90 (1): 114-117, 1977.
24. Wiltshaw, H., Moloney, W. C., Biochemical and histochemical studies on leukocyte alkaline phosphatase, *Blood* 10: 1120-1139, 1955.

25. Kemp, J. A., Herndon, J. W., Wright, C. S., Vacillations in leukocyte alkaline phosphatase, *Southern, Med. J.* 55: 281-290, 1962.
26. Curtius, H. Ch., Roth, M., *Clinical Biochemistry, Principles and Methods*, C. II, London, Walter de Gruyter, 1974, s. 1164, 1224.
27. Beck, W. S., Follete, J. H., Milis, H., et. al., Biochemical studies on chronic myelocytic leukameia, polycythemia vera, and other myeloproliferative disorders, *Blood*: 7: 959-964, 1952.
28. Meislin, A. G., Lee, S. L., Iesserman, L. R., Leukocyte alkaline phosphatase in hematopoietic disorders, *Cancer* 12: 760-766, 1959.
29. Beisel, W. R., Neutrophil alkaline phosphatase in tularemia, sandly fever, Q-fever, and noninfectious fever, *Blood* 29 (2): 247-258, 1967.
30. Nagatoma, C., Hojoh, M., Neutrophil alkaline phosphatase in diabetes mellitus (Japanese), *J. Showa Med. Ass.* 29 (2): 22-28, 1969.
31. Silverstein, M. N., Elveback, L. R., Leukocyte alkaline phosphatase in agnogenic myeloid metaplasia. *Am. J. Clin. Path.* 61: 307-311, 1974.
32. Ćrubowitz, S., Kirman, D., Masek, B., Leukocyte alkaline phosphatase in mongolism, *Lancet* 2: 486-490, 1962.
33. Rosner, F., Schreiber, Z. R., Parise, F., Leukocyte alkaline phosphatase: fluctuations with disease status in chronic granulocytic leukaemia, *Arch. Int. Med.* 10: 892-894, 1972.
34. Tanaka, K. R., Valentine, W. N., Fredricks, R. E., Disease or clinical conditions associated with lowleukocyte alkaline phosphatase, *New Eng. J. Med.* 262: 912-918, 1960.
35. Beisel, W.R., Benjamin, N., Austen, K. F., Absence of leukocyte alkaline phosphatase activity in hypophosphatasia, *Blood* 14: 975-977, 1959.
36. Macoy, E. E., Ebadi, M., England, J., Steroid mediated changes of leukocyte alkaline phosphatase activity in Down's syndrome, *Ped.* 38 (6): 966-1002. 1966.
37. Özsoylu, Ş., Lukocyte, alkaline phosphatase in rickets due to vitamin D deficiency, *New Eng. J. Med.* 280: 1221-1223, 1969.
38. Bainton, D. F., Sequential degranulation of the two types of polymorphonuclear leukocyte granules during phagocytosis of microorganism, *J. Cell Biol.* 58: 249-264, 1973.
39. Fehr, J., Grossmann, H. C., Disparity between circulating and marginating neutrophils: evidence from studies on the granulocyte alkaline phosphatase, a marker of cell maturity. *Am. J. Haematol.* 7 (4): 369-379, 1979.

40. Williams, D. N., Leucocyte alkaline phosphatase as a marker of cell maturity: a quantitative cytochemical and autocardigraphic study, *Br. J. Haematol.* 1 (3): 371-379, 1974.
41. Rausch, P. G., Canonico, P. G., Characterization of monkey peripheral neutrophil granules during infection, *Infect. Immun.* 12 (3): 687-693, 1975.
42. Rausch, P. G., Moore, I. G., Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils- a phylogenetic comparison, *Blood* 49: 913-919, 1975.
28. Meislin, A. G., Lee, S. L., Leukocyte alkaline phosphatase in hematopoietic disorders, *Cancer* 11: 780-786, 1959.
29. Beisel, W. R., Neutrophil alkaline phosphatase in tuberculous, viral, and noninfectious fever, *Blood* 29 (5): 547-558, 1967.
30. Nejatollahi, C., Hojati, M., Neutrophil alkaline phosphatase in diabetic mellitus (Japanese), *J. S. Soc. Med. Assoc.* 59 (7): 23-28, 1969.
31. Shvetsky, M. N., Pecher, L. R., Leukocyte alkaline phosphatase in agnogenic myeloid leukaemia, *Am. J. Clin. Pathol.* 41: 37-51, 1971.
32. Ginzburg, N., Kohn, D., Meislin, A. G., Leukocyte alkaline phosphatase in myeloid leukaemia, *Leuk. Res. J.* 4: 45-49, 1967.
33. Rosner, F., Schreiber, R., Borker, P., Leukocyte alkaline phosphatase in chronic myeloid leukaemia, *Am. J. Clin. Pathol.* 41: 37-51, 1971.
34. Tanaka, K., R. Yoshida, W. N. Yoshida, Leukocyte alkaline phosphatase in chronic myeloid leukaemia, *Am. J. Clin. Pathol.* 41: 37-51, 1971.
35. Beisel, W. R., Benoit, N., Austin, W., Leukocyte alkaline phosphatase activity in chronic myeloid leukaemia, *Blood* 14: 973-977, 1959.
36. Marrow, I. T., Leukocyte alkaline phosphatase activity in chronic myeloid leukaemia, *Am. J. Clin. Pathol.* 41: 37-51, 1971.
37. Ginzburg, N., Leukocyte alkaline phosphatase activity in chronic myeloid leukaemia, *Am. J. Clin. Pathol.* 41: 37-51, 1971.
38. Ballantyne, P. E., Sequential degeneration of the granules of polymorphonuclear neutrophils during infection, *Am. J. Clin. Pathol.* 41: 37-51, 1971.
39. Leukocyte alkaline phosphatase activity in chronic myeloid leukaemia, *Am. J. Clin. Pathol.* 41: 37-51, 1971.