

T.C  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI

17782

**MONOKLONAL ANTİKOR TEKNİĞİ  
İLE ÇOCUKLUK ÇAĞI  
AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİSİNİN  
İMMÜNOLOJİK SINIFLANDIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Emre ALHAN**

T. C.  
Yükseköğretim Kurumu  
Dokümantasyon Merkezi

**Adana, 1990**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
I. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
II. GENEL BİLGİLER .....	4
1. Lenfoid Sistem ve İmmün cevap .....	4
2. Lenfositler .....	5
T- Lenfositler .....	5
B- Lenfositler .....	9
Üçüncü popülasyon hücreleri .....	13
3. Monoklonal Antikorlar .....	14
4. Lenfoproliferatif Hastalıkların İmmünofenotipi .....	19
5. Akut Lösemi .....	21
ALL'nin immünolojik fenotipleri .....	23
Non T-ALL .....	25
T-ALL .....	27
III. MATERYAL VE METOD .....	30
IV. BULGULAR .....	41
V. TARTIŞMA .....	48
VI. ÖZET .....	52
VII. KAYNAKLAR .....	54

## KISALTMALAR

AFP	Alfa fetoprotein
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
ANLL	Akut non lenfoblastik lösemi
BK	Beyaz küre
CALLA	Common akut lenfoblastik lösemi antijeni
CEA	Karsino embriyonik antijen
CD	Cluster Designation
C <sub>g</sub>	Sitoplazmik immünoglobulin
C <sub>μ</sub>	Sitoplazmik μ ağır zincir
E-rozet	Koyun eritrositleri-rozet
FAB	French-American-British
FCS	Fetal calf serum
FITC	Florescein Isothiocyanate Conjugate
HAT	Hypoxanthine-aminopterin-thymidine
HLA	İnsan (human) lökosit antijeni
HPRT	Hypoxanthine phosphorobosyl transferase
Htc	Hematokrit
Ia	İmmün (associated) antijen
Ig	İmmünoglobulin
IL	İnterlökin
LGL	Large (geniş) granüler lenfosit
KLL	Kronik lenfositik lösemi
MoAb	Monoklonal Antikor
OK	Ortho, Kung
PAS	Periodic-acid-schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polyethylene glycol
PY	Periferik yayma
SMIg	Surface (yüzey) membran immunoglobulin
SRBC	Sheep red blood cells (koyun kırmızı kan hücreleri)
Tc/s	Sitotoksik/süpresor (baskılayıcı-T)
Tdt	Terminal deoksinükleotidil transferase
T <sub>h</sub>	T-helper (yardımcı-T)
WHO	World Health Organization (Dünya sağlık örgütü)

## GİRİŞ VE AMAÇ

Hastalıkların immünolojik durumunu belirlemek için lenfositlerin hücre yüzey antijenlerinin incelenmesi son yıllarda giderek önem kazanmaktadır. Ayrıca lösemiler gibi kendi içlerinde büyük heterojenite gösteren hastalıkların kaynaklandığı hücre tipinin belirlenmesinde hücre yüzey antijenlerinin incelenmesi ile yapılan çalışmalar yararlı olmaktadır.

Lösemiler geçmiş yıllarda blastların morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılmakta idi. Ancak bu sınıflandırma farklı hücre alt gruplarını belirlemede yeterli olmamakta ve araştırmacılar arasında görüş ayrılıklarına neden olmakta idi. Son onbeş yılda hibridoma teknolojisinin bulunması ve bu sayede monoklonal antikörlerin uygulama alanına girmesi ile birlikte, hücre fenotipi tayininde hızlı, duyarlı ve güvenilir metodlar geliştirilmiştir. Monoklonal antikörler yardımı ile normal hücrelerin olduğu kadar neoplastik hücrelerin de yüzey antijenlerini belirlemek mümkün olmuştur. Son yıllarda lenfoblastların sahip oldukları hücre yüzey antijenleri belirlenerek lösemilerin immünofenotipik sınıflandırılması yeniden yapılmıştır. Lenfoblastların immünofenotipinin belirlenmesi akut lenfoblastik lösemi olgularının prognozunu tayin etmede ve tedavi seçiminde yararlı olmaktadır.

Monoklonal antikörlerin kullanım alanına girmesi ile birlikte kanser teşhis ve tedavisinde yeni bir çağ açılmıştır. Gelecekte monoklonal antikörlerle konjuge edilmiş isotopların, ilaçların ve/veya toksinlerin bazı lösemi ve lenfomaların tedavisinde rol oynayacağı düşünülerek bu konuda çalışmalar yoğunlaştırılmıştır.

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Çocuk Hematoloji - Onkoloji Bilim Dalında yeni teşhis edilmiş akut lenfoblastik lösemi olgularında hücre yüzey antijenlerinin klasik metodlarla ve monoklonal antikörlerle belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

# G E N E L B İ L G İ L E R

## LENFOİD SİSTEM VE İMMÜN CEVAP

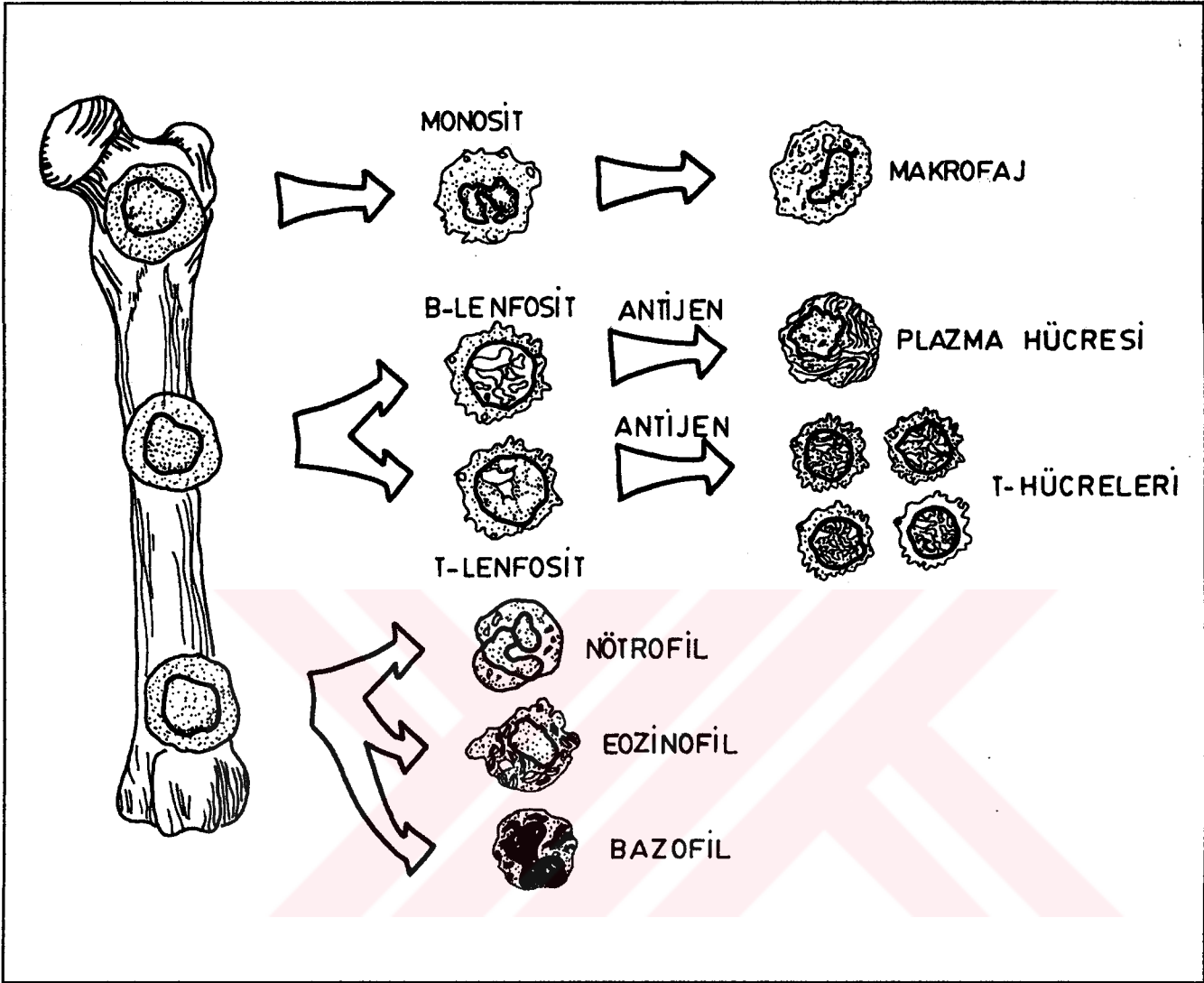
İmmünite (bağışıklık); vücuda giren yabancı maddelerin nötralize edilmesi, dışarıya atılması veya metabolize edilmesi için vücudun geliştirdiği savunma mekanizmasıdır. Mikroorganizmalara, malignensilere ve otoimmün fenomenlere karşı konağın savunma mekanizmalarını içeren kompleks bir sistem olan immün sistem başlıca hücresele immünite, hümoral immünite, fagositik sistem ve kompleman sistemi olmak üzere dört ana unsurdan meydana gelmiştir. İmmün sistemi oluşturan hücrelerin iki ana farklılaşma şekli vardır:

- 1- Lenfoide seri: Lenfositleri yapar,
- 2- Myeloid seri: Fagositleri ve diğer hücreleri yapar.

Lenfoide seride hücresele immüniteden sorumlu T- Lenfositler ve hümoral immüniteden sorumlu B- Lenfositler olmak üzere fonksiyonları farklı iki ana hücre gurubu vardır. Fagositler gurubunda ise monositler ve polimorf nüveli lökositler (nötrofiller, eozinofiller, ve bazofiller) iki temel hücreyi oluştururlar. Şekil 1'de immünolojik aktif efektör hücrelerin gelişimi şema halinde gösterilmiştir.

Bütün bu hücre sistemleri birbirlerine son derece bağlı olmalarına rağmen fonksiyonları farklıdır. Bu iki hücre sistemine ek olarak "aksesuar hücreler" immün cevabın oluşmasında önemli rol oynarlar.

Bir antijene karşı immün cevap oluşabilmesi T ve B lenfositleri, monositler ve MHC (major histocompatibility complex) ürünleri arasındaki kompleks bir reaksiyon serisinin gerçekleşmesine bağlıdır. Bunlardan başka diğer hücre tipleri de immün cevabın oluşumuna katılabilmektedir. Bu hücreler arasında dentritik hücreler, NK (naturel killer) hücreleri, Langerhans hücreleri ve endotelyal hücreler bulunmaktadır.



ŞEKİL I: İmmünolojik aktif efektör hücreler kemik iliğinden köken alırlar. Kemik iliğindeki promonositlerden köken alan dolaşımdaki monositler dokulara giderek makrofaj haline gelirler. Lenfoid serinin öncül hücreleri (pre-B,ve pre-T) lenfoid stem hücrelerinden kaynaklanırlar. Pre-T hücreleri timusta olgunlaşarak dolaşıma T-Lenfositleri olarak çıkarılarken, pre-B hücreleri de kuşlarda bursa fabricius'da (memelilerde ise bunun eşdeğer organlarında) olgunlaşarak B-Lenfositleri olarak dolaşıma katılırlar. B hücreleri dahada olgunlaşarak immünoglobülin salgılayan plazma hücrelerini meydana getirirler. T hücreleri ise belirli bir morfolojik değişikliğe uğramadan bölünürler. Nötrofiller, eozinofiller, ve bazofiller ise myeloid stem hücrelerinden köken alırlar.

## LENFOİD SİSTEM

Lenfoid sistemin lenfoid dokuları santral (primer) ve periferik (sekonder) olmak üzere ikiye ayrılırlar. Santral lenfoid organları kemik iliği, timus ve kuşlarda "bursa of fabricius" dur. Periferik lenfoid organlar ise lenf nodları, dalak, tonsiller ve Peyer plakları gibi intestinal lenfoid dokulardır.

### LENFOSİTLER:

Tüm lenfoid dokunun en önemli hücresi olan lenfositler, kemik iliğindeki lenfoblastlardan köken alırlar ve erişkinlerin dolaşımlarındaki lökositlerin %20-30'unu oluştururlar. Lenfositler, bir çok dokuya kan dolaşımı yolu ile taşınırlar. Bu dokulardan en önemlileri timus ve bursa fabricius'dur. Timus ve bursa fabricius (memelilerde eş değeri) lenfositlerin kendilerine has fonksiyonlarının kazanıldığı veya onların T veya B lenfositleri olarak regüle edildiği en önemli lenfoid organlardır.

Başlangıçta lenfositler; 6 -10 µm çapında olanlar küçük lenfosit, 16-20 µm çapında olanlar ise büyük lenfosit olarak sınıflandırılırlardı ve bir de ara sınıftan (intermedia) bahsedilirdi.<sup>(1)</sup>

Lenfositleri sınıflandırmadaki bir yöntem de onları yarı ömürlerine göre iki gruba ayırmaktı. Yarı ömrü 5-7 gün gibi kısa ama genellikle daha büyük olanlar B-lenfositler olarak tanımlanırken; küçük ama yarı ömrü aylar ve yıllar gibi uzun olanlar ise T-lenfositler olarak tanımlanmakta idiler. <sup>(1)</sup>

Günümüzde hücre yüzey membran antijenlerini belirleyen spesifik monoklonal antikorların, immünglobulinlerin ve T hücresi reseptör genlerini belirleyen moleküler çalışmaların kullanım alanına girmesi ile birlikte insan lenfosit ve granüositlerinin farklılaşma safhalarını belirlemek mümkündür. <sup>(21,54,63)</sup>

### T-LENFOSİTLERİ:

İmmün sistemin hücresel komponentini oluşturan T-lenfositlerinin öncüleri (pre-T lenfositler) doğumdan önce fetal karaciğerden, doğumdan sonra ise kemik iliğinden köken alırlar, farklılaşma ve olgunlaşmaları ise timusta meydana gelir. Bu farklılaşma sürecinde T-hücrelerinin bir çok spesifik alt sınıfı meydana gelir ki bunların her birinin ayrı birer spesifik

fonksiyonu vardır.

Timus, insanlarda boyunda tiroidin altında bulunan ve thoraks boşluğuna doğru uzanan çift loblu bir organdır. Embriyolojik olarak 8. haftada 3. ve 4. farangeal keselerden meydana gelir, doğum esnasında ağırlığı 15-20 gr.dır. Pubertede ağırlığı 40 gr.ı bulur ve bundan sonra atrofiye uğrar. Anatomik olarak timus; vasküler ve lenfotik sistemlerle beslenen ve drene olan, içleri lenfositlerle (timik veya T-lenfositleri) dolu epitelyal keseler olarak tanımlanabilir. Epitelyal ve diğer yapısal hücreler timusu lobüllere ayırır. Her lobülün lenfositten zengin dış-korteks kısmı ve lenfositten fakir iç-medulla kısmı vardır. Kortikal timositler timik lenfositlerin %85-90 ını oluştururken geri kalanlar meduller timositlerdir.<sup>(1)</sup>

Korteksde olgunlaşmamış ve çoğalmaya hazırlanan, medullada ise olgun hücrelerin bulunması, kortekste mitozla oluşan lenfositlerin medullaya göç ettiğini burada daha da olgunlaşarak kan dolaşımına geçtiğini düşündürmektedir.<sup>(47)</sup>

Timusta epitelyal hücreler bazı timik hormonları sentez ederler. Bunlardan thymulin,  $\alpha 1$  ve  $\beta 4$ - thymosin thymopietin (ve onun aktif pentopeptidi olan TP-5) iyi bilinenlerdir. İn vitro deneylerde timustaki hücrelerin bu hormonların yardımı ile farklılaştıkları ve Ia antijeni (immün associated antigen), Tdt (terminal deoksinukleotidil transferaz enzimi), Fc reseptörleri ve T hücresine spesifik bir seri yüzey antijenlerini kazandıkları gösterilmiştir.<sup>(35)</sup>

T-hücrelerinin gelişimi periferik lenfoid organlara yerleşimi ile tamamlanır. Bu organlarda T-hücresine bağımlı bölgelere yerleşerek uzun yaşam süresine sahip bir popülasyon oluşturarak tekrar dolaşıma katılırlar.

T-lenfositlerinin farklılaşması en iyi olgunlaşma safhasının muhtelif evrelerinde kazandıkları ve kaybettikleri yüzey proteinleri ile açıklanır. Ancak ne var ki, bu proteinler için kullanılan 4 ayrı nomenklatür sistemi vardır. Bunlardan biri fareler için (Ly), ikisi insanlar için (T, Leu) ve dördüncüsü de WHO'nun önerdiği (CD) şemalarıdır.

T hücrelerinin kemik iliği prekürsörlerinde Tdt enzimi bulunur. Monoklonal antikorların kullanılması ile birlikte belirlenmeye başlanan yüzey antijenleri T harfini takip eden 1 ila 11 arası rakamlarla gösterilir (T1,T3,T4.....T11 gibi). Buna alternatif olarak karışıklıkları ve kolay anlaşmayı amaçlayan sistem, dünya sağlık teşkilatının önerdiği CD (Cluster Designation'un baş harfleri) sistemidir. Bu sistemde T harfinin yerine CD harfi gelmiştir ve numaralandırma



rakamlarla gösterilmektedir. (Ör: CD8 gibi). Günümüze dek bu markırlardan çok azının T hücre fonksiyonu ile ilişkisi gösterilmiştir. T1,T3,T10 ve T11 tüm olgun T lenfositlerinde bulunurken sadece T3 ve T11 in belirleyici rolü vardır. T6 ve T9 markırları timositlerde bulunur ve bu hücreler kan dolaşımına geçtiğinde bu iki markır kaybolurlar. Timik T hücreleri olgunlaştıkça T4 ve T8 belirir ki bu markırlar hücreleri iki fonksiyonel alt gruba ayırırlar.<sup>(1)</sup> (yardımcı-T, baskılayıcı/sitotoksik-T)

Monoklonal antikorlar kullanılarak hücre yüzey antijenlerdeki değişikliklere göre T hücre gelişiminin 3 ayrı safhası belirlenmiştir.<sup>(47)</sup> Şekil IV'de T hücresi gelişiminin safhaları ve bu safhalarda kazanılan ve kaybedilen yüzey antijenleri gösterilmiştir.

EVRE I : Erken timositler, Timik T hücrelerinin %10'unu oluştururlar. Koyun eritrositleri resöptörleri ve T1,T9,T10 monoklonal antikorları tarafından tanınan antijenleri vardır.

EVRE II : Ara (intermediate) timositler, timositlerin büyük çoğunluğunu içerir. T9 kaybolur, T10 halen vardır ve T6, T4 (CD4) ve T8 (CD8) antijenleri kazanılmıştır.

EVRE III : Olgunlaşmanın son safhasında timositler artık T6 içermezler. Diğer antijenlere ek olarak T3 antijeni kazanılmıştır. Periferik kandaki lenfositler gibi T4 ve T8 alt gruplarına ayrılırlar.

T-lenfositlerin belirlenmesinde yararları olan yüzey markırlarının dışında bu hücrelerin yüzeylerinde eritrosit reseptörleri, Ia-protein reseptörü, T-hücre antijen reseptörü (Ti) gibi bazı önemli moleküller vardır. T- hücreleri koyun eritrositleri ile rozet teşekkül ederler. Bu basit teknikle periferik kandaki lenfositlerin yaklaşık üçte ikisinin T-lenfositleri olduğu anlaşılır. Geri kalan lenfositlerin %30 u B- hücreleri ve geri kalanları da üçüncü popülasyon hücreleridir. Bazı T-hücrelerinde bulunan ikinci önemli reseptör Ia proteinleri için spesifiktir. Kimyasal yapısı halen karanlık olan bu Ia proteinine B- hücrelerinde ve makrofajlarda da rastlanır, ve bu hücrelerin TD (timus-dependent) antijenlerine karşı immün cevabı başlattığı düşünülür. Bir üçüncü reseptör olan T hücre antijen reseptörü (Ti) molekülleri alfa ve beta peptid zincirlerinden meydana gelmiştir ve muhtemelen üçüncü bir parçaları da  $\gamma$  zinciridir. Ti proteini ile T3 proteini arasında yakın bir ilişki vardır ve bu yüzden antiserumlarla ikisinden hangisinin pozitif olduğu

belirlenemez. Çünkü Ti peptidlerine nazaran hücre membranından daha içerde bulunan T3 molekülü Ti molekülünün peptidleri ile bağlanmıştır. Bunların dışında T hücrelerinde interlökin reseptörleri (IL-1 ve IL-2) vardır. Makrofaj interlökin-1 T- hücrelerindeki reseptörlere bağlanır ve T hücre cevabını katalize eder. Bunun ardından T<sub>h</sub> hücreleri IL-2 salgılayarak diğer fonksiyonel T hücre alt gruplarını stimüle ederler.<sup>(1)</sup>

Mevcut olan bir çok T proteinine karşılık dört tanesinin belirleyici özelliği önemlidir. T3 ün T- hücre antijen resertörüyle (Ti) yakın ilişkisi vardır. T11 koyun eritrositleri reseptörüdür. T4 yardımcı T hücrelerinin (T<sub>h</sub>) ve T<sub>DTH</sub> (gecikmiş tipte duyarlılık T hücreleri) markıdır. T hücrelerinin yaklaşık %60'ı bu markıra sahiptir. T8 ise T<sub>c</sub> ve T<sub>s</sub> (baskılayıcı ve sitotoksik-T) hücrelerinin pozitif markıdır.

Antikor üretimi için T ve B hücreleri arasında bir etkileşim gerekmektedir. B hücrelerinin bazı antijenlere (T-ye bağımlı antijen ) karşı antikor yanıtı, yardımcı-T hücrelerinin katkısı ile oluşur. Yardımcı T- hücrelerinin aktivasyonu için ise aksesuar hücreler gereklidir.

Bir T- hücre alt grubu olan baskılayıcı T- hücreler, B hücrelerinin ve diğer T hücrelerinin aktivasyonunu inhibe ederler.

Yardımcı T hücrelerinin B hücrelerini aktive edici fonksiyonuna karşılık baskılayıcı T-hücreler, B-hücrelerinin fonksiyonlarını azaltırlar. İnsanlarda ve diğer hayvanlarda yardımcı T- hücrelerinin baskılayıcı T hücrelerine oranı (Th: Ts) 1.8:1 dir. Aşırı süpresyon immün yetersizliğe, süpresyonun olmaması veya çok azalması otoimmüniteye neden olabilir.

T hücrelerini belirleyen bir çok antiserum ve monoklonal antikor mevcut olup,bunlar tablo II'de gösterilmiştir.

### **B-LENFOSİTLERİ :**

B lenfositleri, humoral immüniteden sorumludurlar. B lenfosit öncüleri insanlarda gestasyonun 8.-9. haftalarında, farelerde ise 14. günde fetal karaciğerde bulunurlar. Gestasyonun 14. haftasından itibaren kuşlarda "Bursa of Fabricius"da memelilerde ise bursa eşdeğerlerinde (insanlarda kemik iliği ) olgunlaşarak kan dolaşımına ve periferik lenfoid dokuya yerleşirler.<sup>(17)</sup> Plazma hücreleri B-lenfositlerinin en olgun şeklidir ve aktif olarak immünglobulin salgırlar.

B lenfositleri genellikle yüzey membranlarında bulunan bir antijen reseptörü olarak görev yapan immünglobulin varlığı ile belirlenebilirler. Yüzey membran immünglobulin (SmIg) çeşitli immünglobulin sınıflarına karşı geliştirilen polivalan ve monoklonal antiserumlar kullanılarak gösterilebilir. Bu markır yardımı ile dolaşımdaki lenfositlerin %15-30 unun; lenfoid dokuda ve tonsillerde ise yaklaşık %50 sinin B lenfositler olduğu anlaşılır.<sup>(1)</sup>

#### *B-Lenfositlerinin Farklılaşması ve Yüzey Markırları :*

Kemik iliği kökenli olan B-lenfosit öncüleri (pre-B lenfositler) IgM'nin ağır zincirini ( $\mu$ ) sentez ederler, ancak sekrete etmezler. Bu IgM'nin ağır zinciri sitoplazmada bulunur, sitoplazmik  $\mu$  zinciri ( $C\mu$ ) adını alır. Pre-B lenfositlerin SmIg'leri ve intrasitoplazmik hafif zincirleri yoktur.<sup>(21)</sup>

IgM molekülünün tamamen oluşması ile birlikte pre-B hücreleri, erken B hücrelerine doğru farklılaşırlar. Erken B- hücrelerinin yüzeylerinde Ia proteini, Fc reseptörü ve komplemanın CR1 ve CR3 reseptörleri bulunur.

Olgun B hücrelerinde kompleman reseptörleri, Fc reseptörleri ve yüzey IgM reseptörlerinden fazla olarak IgD de bulunur. Fc ve kompleman reseptörleri B lenfositler için spesifik olmayıp monositler ve bazı nonhemopoetik hücrelerde de bulunabilirler. Bunun gibi, insan B lenfositlerinin yüzeyinde bulunan Ia antijeni de yalnız B hücrelerine özgül değildir. Ia antijenleri ile HLA-D dokusu gen ürünleri arasında ilişki saptandığından HLA-D ile ilişkili veya HLA-DR deyimi insan hücrelerindeki Ia antijeninin varlığını göstermek için kullanılmaktadır.<sup>(21)</sup>

B hücreleri erken formlarından itibaren antijenik stimülasyona immünglobulin sentezleyerek cevap verirler. B hücreleri uygun antijenle karşılaştıktan sonra T- hücrelerinin yardımı ile klonal bir gelişme göstererek, yüzey Ig molekülü ile aynı özgüllükte Ig molekülleri sentez etmeye başlarlar. Bu işlem sonucunda da ortalama yaşam süreleri 2-3 gün olan en olgun B hücrelerine yani plazma hücreleri farklılaşır. Plazma hücrelerinin SmIg'i yoktur, ancak hem ağır hem de hafif zincirlerden meydana gelen Clg leri vardır. Öte yandan bu farklılaşma süreci içinde bu klondaki bazı hücreler "hafıza hücreleri" denilen yaşam süreleri oldukça uzun olan lenfositlere dönüşerek lenfoid dokuların terminal merkezlerine yerleşirler.<sup>(17)</sup>

B- hücrelerini belirleyen bir çok antiserum ve monoklonal antikorlar belirlenmiş

olup Tablo III'de gösterilmiştir. B hücrelerinin olgunlaşması ile paralellik gösteren yüzey markırlar Şekil IV'de gösterilmiştir. Bunların dışında major histokompatibility kompleksinin klas I proteini çok erken-B hücrelerinin yüzeyinde bulunurken daha geç safhalarda Lyb 3,5 proteinleri mevcuttur. Lyb6, Lyb17, Lyb19 gibi diğer Lyb (lenfosit B) proteinleri de B lenfositlerde bulunmuştur, ancak bunların fonksiyonları henüz bilinmemektedir. (1)

**TABLO I : T ve B Lenfositlerin Karakteristik Özellikleri**

	<b>B-Lenfosit</b>	<b>T-Lenfosit</b>
Doku orjini	Kemik iliği	Kemik iliği
Olgunlaşmanın olduğu dokular	Fabricius Bursa ve bursa eş değerleri	Timus
Yüzey markırları	1. Fc Reseptörü 2. İmmünglobulin 3. CR3	1. T1 veya Thy 1 2. Lyt veya CD markırları 3. IL-1 ve IL-2 reseptörleri 4. Ia Proteinini
Antijen reseptörü	IgM ve IgD	T <sub>H</sub> +T <sub>S</sub>
Fonksiyonel alt sınıflar	B <sub>μ</sub> , B <sub>γ</sub> , B <sub>α</sub> , B <sub>δ</sub> , B <sub>ε</sub>	T <sub>H</sub> , T <sub>DTH</sub> , T <sub>C</sub> , T <sub>S</sub> , T <sub>CS</sub>
Alt sınıf varyantları	κ ve λ zincir varyantları	T <sub>S</sub> ve T <sub>CS</sub> , muhtemelen T <sub>H</sub>
Hücre ürünleri	İmmünglobulinler	İnterlökinler
Dokulara dağılım	Kanda az, dalakta fazla,	Kanda ve duktus thoracicusda fazla
İmmün tolerans	Yüksek doz, kısa süre	Düşük doz, uzun süre

B hücreleri ortak bir çok özellikleri bulunmasına rağmen, sentez ettikleri immünglobulin cinsi esas alınarak bir çok alt gruba ayrılabilirler. Örneğin pre-B hücrelerinden sadece IgM (B<sub>μ</sub>), sadece IgG (B<sub>γ</sub>) gibi B<sub>α</sub>, B<sub>δ</sub> ve B<sub>ε</sub> alt grupları farklılaşabilir. (1) B hücreleri immünglobulinlerinde bulunan hafif zincirlerin tipi (κ veya λ) ve ağır zincirinin alt grupları esas alınarak da major gruplara sınıflandırılabilir (B<sub>μκ</sub>, B<sub>μλ</sub>, B<sub>γκ</sub>, B<sub>γλ</sub>). T ve B hücrelerinin arasındaki farklar tablo'I'de gösterilmiştir.

**TABLO II : İnsan T lenfositleri ile reaksiyona giren monoklonal antikorlar**

Antikor (Altsınıf)	Reaksiyona girdiği hücreler	Antijenin Mol Ağırlığı (kd)	CD
OKT1, anti-T1, anti-Leu-1,10.2 (Lyt-2) SC-1, A50, T101	Pan-T lenfosit, pantisomit	65	CD5
OKT3, anti T3, anti-Leu-4, UCHT1 Anti-Ti	Pan-T lenfosit (mitojenik) ThÜcre antijen reseptörü	20,20,25 49-51(...) 43 (..)	CD3 HV
12.1,T4 11	Pan-T, B altsınıfları	120	CD6
OKT11, anti T 11, anti-Leu-5, 9.6 (Lyt-3)	Pan-T lenfosit (koyun eritrositi reseptörü)	40-50	CD2
3A1,anti-Leu-9 (4H9), WT1, 4A	Pan-T lenfosit	40	CD7
OKT4,anti-T4,anti-Leu-3	Yardımcı T	55	CD4
Anti-TQ1	Yardımcı T altsınıfları	Y	HV
OKT5,OKT8,anti-T8,anti-Leu-2	Baskılayıcı /sitotoksik - T	32-43	CD8
OKT6, NA 1/34, anti-Leu-6	Timositler	45	CD1
OKT9,5E9	Timositler, lenfoblastlar, monositler (anti-transferin)	90	HV
OKT10	Timositler	45	HV
Anti-Ta <sub>1</sub>	Aktive T lenfositler	105	HV
Anti-Tac	Interlökin-2 reseptörü	55	CD25

Kısaltmalar : Y : yayınlanmadı; HV henüz verilmedi

**TABLO III : İnsan B lenfositleri ile reaksiyona giren monoklonal antikorlar**

Antikor (Altsınıf)	Reaksiyona girdiği hücreler	Antijenin Mol Ağırlığı (kd)	CD
BA-1 (IgM)	B Lenfositler, granülostiler, malign B hücreleri	45,55,65	CD24
FMC 1 (IgM)	B Lenfositler, malign B hücreleri	Y	HV
FMC 7	B lenfositler (<%50), bazı malign B hücreleri	Y	HV
Anti-B1 (IgG <sub>2</sub> )	B Lenfositleri, malign B hücreleri	35	CD20
Anti B2 (IgM)	B Lenfositleri malign B hücreleri (C3d ve Epstein-Barr virüs için reseptör)	140	CD21
Anti-B4 (IgG <sub>1</sub> )	B Lenfositleri, malign B hücreleri	40	CD19
Anti-B5 (IgM)	Aktive B lenfositler, malign B hücreleri	75	HV
P1153 / 3	B Lenfositleri, malign B hücreleri	Y	HV
OKB1 (IgG <sub>1</sub> )	B Lenfositleri, malign B hücreleri	168	HV
OKB2 (IgG <sub>1</sub> )	B Lenfositler, granülostiler	Y	HV
OKB4 (IgM)	B Lenfositleri, malign B hücreleri	87	HV
OKB7 (IgG <sub>2a</sub> )	B Lenfositleri, malign B hücreleri	175	HV
Anti- HLB-1 (IgG <sub>2a</sub> )	B Lenfositleri, malign B hücreleri	Y	HV
41H.16 (IgG <sub>2a</sub> )	B Lenfositleri, malign B hücreleri	39	HV
Anti BL1 (IgG <sub>1</sub> )	B lenfosit altsınıfları, malign B hücreleri,granülostiler	Glikolipid	HV
Anti BL2 (IgG <sub>2a</sub> )	B lenfositler, malign B hücreleri, aktive T hücreleri	68	HV
Anti BL3 (IgG <sub>1</sub> )	B lenfosit alt sınıfları, bazı malign B hücreleri, plazma hücreleri, aktive T hücreleri	105	HV
Anti-PCA-1 (IgG <sub>2a</sub> ) ve anti-PCA-2 (IgG <sub>1</sub> )	Plazma hücreleri, malign plazma hücreleri, monositler ve granülostiler ( zayıf )	Y	HV
Anti-PC-1 (IgM )	Plazma hücreleri malign plazma hücreleri	28	HV
LN-1 (IgM )	B lenfositler, malign B hücreleri,epitelyal tümörler	Sialoantijen	HV
LN-2 (IgG <sub>1</sub> )	B lenfositler, malign B hücreleri (nükleer membran ve stoplazma)	35	
HD6,HD39,29-110	B lenfositlerin % 75'i, bazı malign B hücreleri	135	CD22
SJ10-1H11,SHCL-1			
MNM6,PL-13,Blast-2	Bazı malign B hücreleri	45	CD23

Kısaltmalar : Y : yayınlanmadı; HV henüz verilmedi

## ÜÇÜNCÜ POPÜLASYON HÜCRELERİ

Periferik kan lenfositlerinin yaklaşık % 3'ünü içeren bu lenfositler ne T ne de B lenfositlerine özgül olan hücre yüzey markırlarına sahip değildirler. Fogositik ve adherent değildirler, lenfoid hücre morfolojisindedirler.<sup>(1)</sup>

Bu hücre grubu büyük bir heterojenite göstermektedir.HLA-DR antijenleri ve Fc reseptörü bu hücre grubunun çeşitleri tiplerinin ayırımında önem taşır. <sup>(19)</sup>

Üçüncü popülasyon hücrelerinin %80'ini oluşturan geniş granüler lenfositler (LGL), lenfoid morfolojide, sitoplazmalarında azurofilik granüller içeren hücrelerdir. Geniş granüler lenfositler natürel killer (NK) hücrelerini de içerirler. NK hücreler virüsle enfekte hücreleri ve bazı tümör hücreleri gibi hedef hücrelerini antikor ve kompleman yardımı olmaksızın öldürürler.

Geniş granüler lenfositlerin alt grupları M1 antijeni gibi miyelomonositik işaretlere sahiptirler. Bundan başka hemotopoetik dokulardaki özgül işaretlerden biri olan Leu-7 antijenine sahiptirler. Ayrıca T4, T8 gibi T hücre işaretleri bu hücreler üzerinde gösterilmiştir.Koyun eritrositleri ile de zayıf rozetler oluşturdıkları belirlenmiştir. Bütün bu özelliklerinden dolayı bu hücrelerin ait oldukları hücre serisi tartışmalıdır. <sup>(19)</sup>

## MONOKLONAL ANTİKORLAR

Organizma, antijen özelliği taşıyan yabancı bir madde ile karşılıınca; plazma hücreleri, antijenin üzerindeki bölgelere özgül bağlanma gösterir ve immünglobulin karakterindeki antikorlar sentezleyerek immün cevabı oluşturur.<sup>(1)</sup>

Antijene karşı oluşan antikor cevabı genelde heterojendir. İnsan ve fare türlerinde milyonlarca plazma öncül hücreleri, aynı stem hücrelerinden köken almalarına rağmen, değişik antijenik bölgelere (determinantlara) karşı ayrı özelliklerde antikorlar sentezleyebilmektedirler. İmmünize edilmiş bir hayvanın serumunda değişik tipte ve çok sayıda antikor bir arada bulunmaktadır. Bir tek antijene özgül antikor (monoklonal antikor) üreten hücrelerin, diğer antikor üreten hücrelerden ayrılması ve bu hücrelerin kültürlerde üretilmesi ile sadece belirli bir antijenik bölgeyi belirleyen antikorların in vitro şartlarda üretilmesi uzun yıllar mümkün olmamıştır. Plazma hücrelerinin de kültür şartlarında uzun süreli devamlılığı sağlanamamıştır.

Milstein, 1973 yılında in vitro şartlarda fare myeloma hücre kültürlerinden spontan mutasyon yapmayı başardı. Ardından 1975 yılında Milstein ve Köhler Cambridge Üniversitesi Moleküler Biyoloji laboratuvarında ilk kez antijen verilerek immünize edilmiş farelerden elde edilen dalak hücreleri ile mutand fare myeloma hücrelerini birleştirerek (füzyon) monoklonal antikor sentezleyen "Hybridoma" tekniğini tanımladılar<sup>(33)</sup>. Bu buluş kendilerine 1984 yılı Nobel ödülünü kazandırdı. Bu teknikle, bir yandan B-lenfositlerinin özgül antikor yapıcı özelliklerini diğer yandan ise myeloma hücrelerinin ölümsüz olma özelliğini kazanan "hibrid-melezlerin", özel ortamlarda üretilmesi ile tek bir antijenik bölgeye karşı çok yüksek özgüllükte ve sonsuz miktarlarda monoklonal tipte antikor sentezleyebilecekleri gösterildi. Monoklonal antikorların uygulama alanına girmesi ile birlikte immünoloji, hematoloji, onkoloji, mikrobiyoloji ve gene-

tik alanlarında büyük aşamalar elde edildi. Monoklonal Antikorların Üretilmesi şekil II'de gösterilmiştir.

Monoklonal antikorların hibridoma teknolojisi ile üretilmesinin ilk basamağında fare, antikor üretilen antijenle immünize edilir. Daha sonra bu farenin dalağı çıkarılarak hücre süspansiyonu hazırlanır. Bu süspansiyonda, füzyonda görev alacak temel hücre grubunu oluşturan ve antijene bir cevap olarak proliferen olan B-hücreleri ve plazma hücreleri bulunur. Füzyonda kullanılan ikinci hücre olan mutand fare myeloma hücreleri ise in vitro hücre kültürlerinden elde edilir.

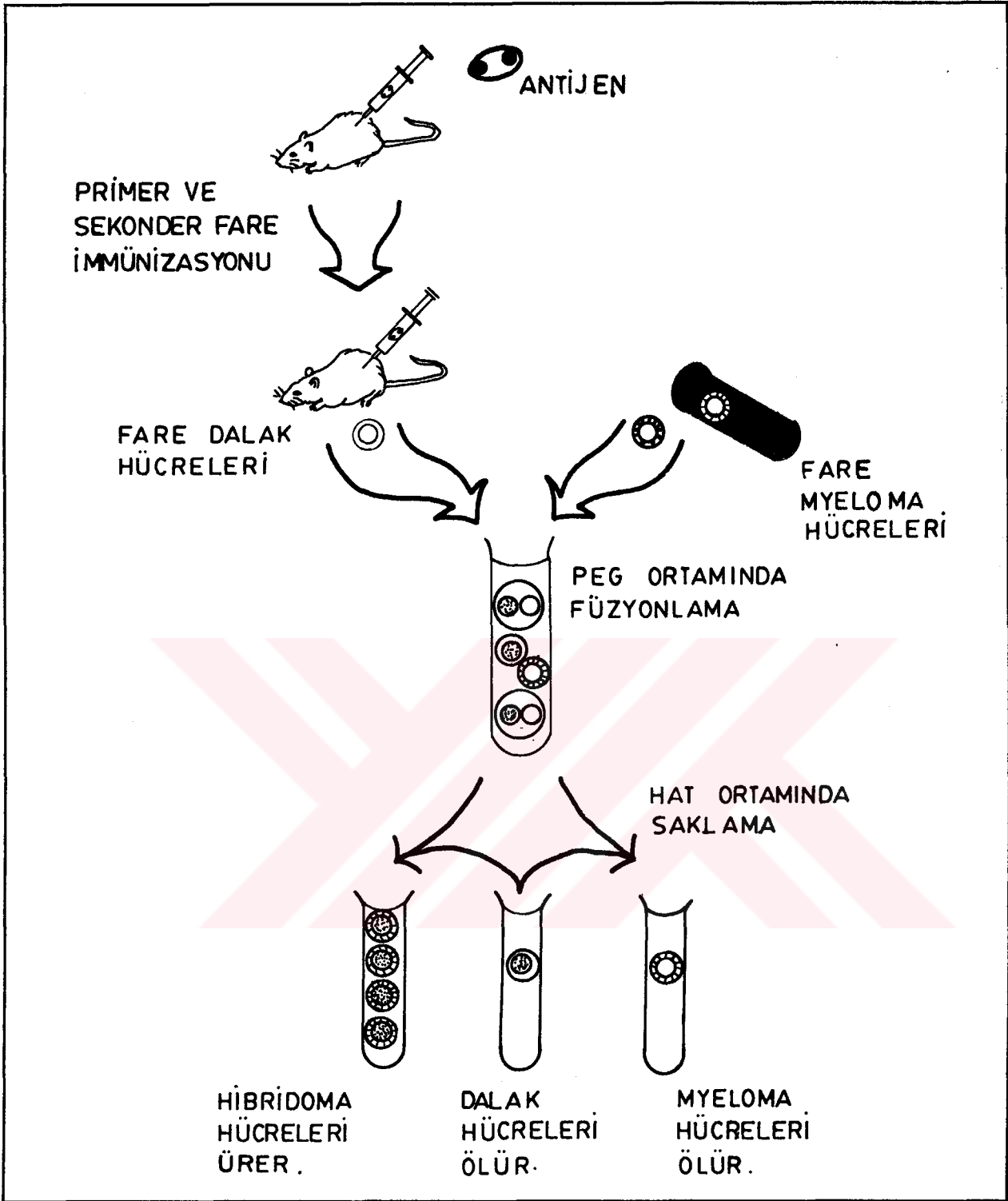
İmmünize fare dalak hücreleri ile mutand myeloma hücreleri polyethylene glycol (PEG) kullanılarak füzyona sokulur ve "microtiter" tipinde hücre kültür plaklarına ekim yapılır.

Füzyon sırasında iki hücrenin membranları birleştirilir. Füzyondan sonra oluşan hibrid (melez) hücrede başlangıçta her iki hücrenin de çekirdeği bulunur. Bu çekirdeklerin füzyona uğraması ile her iki hücreden gelen genetik bilgileri içeren tek bir çekirdek ortaya çıkar.

Bundan sonraki aşamada hücreler HAT (hypoxanthine, aminopterin ve thymidine) ortamında saklanır. HAT ortamının özelliği, içerisinde sadece hibrid hücrelerin üremesidir. Bu ortamda HPRT (hypoxanthine-phosphoribosyl-transferase) enzimi taşımayan (HTRT negatif) hibridleşmemiş mutand hücreleri ve HPRT pozitif olan füzyona girmemiş B lenfositleri kısa sürede ölürler. Sonuç olarak ortamda sadece üremekte olan hibrid hücreleri kalır. (Şekil II)

Elde edilen hibrid hücreler arasından antijene özgül antikor sentezleyenler, indirekt immüno Floresans veya ELİSA yöntemi ile seçilir. Seçilen hücreler klonlanarak tek bir hücre türünden oluşan ve tek tip antikor yapan hibrid hücreler elde edilmiş olur. Bu hücreler sıvı nitrojen içinde dondurulup uzun süre saklanabilmekte, gerektiğinde çözülerek in vitro koşullarda uygun ortamlarda üretilerek veya deney hayvanlarına enjekte edilerek bol miktarda monoklonal antikor elde edilebilmektedir.<sup>(13)</sup>





**ŞEKİL II :** Hibridomaları elde etmek için önce kobayın primer immunizasyonu sağlanır. Kobayın antikor yapan dalak hücreleri ile nonsekretuar miyeloma hücreleri füzyona sokulur ve HAT ortamına konulur. HAT mediumunda sadece hibridoma hücreleri ürer. Hibridoma hücreleri antijenin tek bir bölgesine özgül monoklonal immünglobulinleri sentez ve sekrete ederler.

### *Monoklonal Antikorların Kullanım Alanları :*

Monoklonal antikorların yardımı ile bir çok lökosit yüzey antijeni tanımlanmıştır. İmmün sistem hücrelerinin yüzey antijenlerine özgül monoklonal antikorların geliştirilmesi ile hücrelerin farklılaşması, fonksiyonları ve malign hastalıklar hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir.

Hibridoma teknolojisinin bulunmasından sonra 1979'da Kung ve arkadaşları T-hücre membran yüzey antijenlerine karşı OK (Ortho, Kung) monoklonal antikor serisini geliştirdiler.<sup>(34)</sup> Üç farklı uluslararası sistem ile sınıflandırılan monoklonal antikorlar, karışıklıkları önlemek ve kolay anlaşmayı sağlamak amacıyla günümüzde Dünya Sağlık Teşkilatının (WHO) önerdiği CD (Cluster of Designation) terimleri ile tanımlanmaktadır. Tablo IV'de lökositlerin tiplendirilmesinde kullanılan monoklonal antikorlar toplu halde gösterilmiştir. Örneğin, CD3 tüm T- hücrelerinde bulunurken, CD4 yardımcı T- hücrelerini, CD8 hem baskılayıcı-T, hem de sitotoksik-T hücrelerini belirler.<sup>(27)</sup>

Monoklonal antikorlar, akut lösemi, lenfoma ve diğer tip lenfoproliferatif hastalıkların sınıflandırılmasında büyük yararlar sağlamıştır. Monoklonal antikorlar T- hücre ve non-T-hücreli lösemilerin ayırt edilmesinde ve bu lösemilerin de kendi aralarında sınıflandırılmalarında da kullanılmaktadır.<sup>(17,54)</sup>

Monoklonal antikorların diğer bir kullanım alanı, tümörlerin serolojik tanınması, immünohistolojik tanısı, in vivo yerleşimlerinin gösterilmesi ve tümör immünoterapisidir. Hepatoma tanı ve takibinde alfa fetoprotein (AFP) ve kolon karsinomalarında karsino embriyonik antijen (CEA) tayini için özgül monoklonal antikorlar geliştirilmiştir.<sup>(50,62)</sup>

Ayrıca radyoaktif madde ile işaretli monoklonal antikorlar kullanılarak tümörlerin yerlerini saptamak mümkündür.<sup>(26)</sup>

Monoklonal antikorlar kemik iliği transplantasyonunda tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Graft versus host hastalığını önlemek amacıyla transplantasyonlardan önce kemik iliği komplement ve anti-T3 monoklonal antikorları ile muameleye tutulmaktadır.<sup>(28)</sup>

Tümörlere karşı geliştirilen monoklonal antikorların kemoterapatik ajanlarla konjugasyonu yapılarak bu ilaçların lokal veya metastatik tümöre daha etkili bir şekilde gönderilmesi amacıyla çalışmalar devam etmektedir.<sup>(9)</sup>

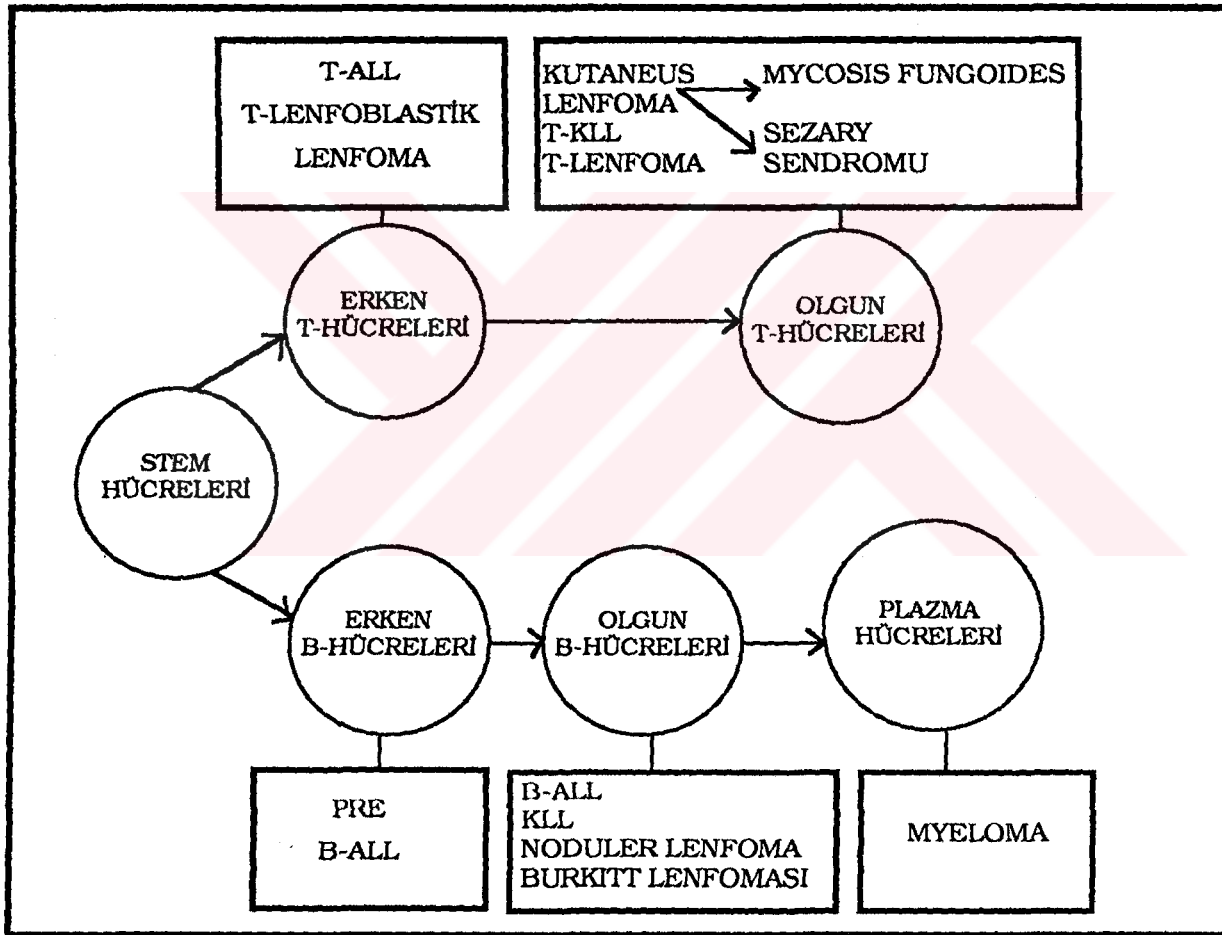
**TABLO IV : Sıklıkla kullanılan monoklonal antikorlar ve CD sınıflandırması**

CD	Antikor
CD1	OKT6, anti-Leu-6,NA 1/34
CD2	OKT11, anti-T11, anti-Leu - 5, 9.6
CD3	OKT3, anti-T3, anti-Leu-4, UCHT-1
CD4	OKT4, anti-T4, anti-Leu-3
CD5	OKT1, anti-T1, anti-Leu-1, 10.2,T101
CD6	12.1, T411
CD7	anti-Leu 9, 3A1, WT1, 4A
CD8	OKT5, OKT8, anti-T8, anti-Leu-2
CD9	BA-2,SJ-9A4, Du-ALL-1
CD10	J-5, BA-3, anti-CALLA
CD11	Mo1/OKM1, Mo5
CDw12	20.2
CDw13	DUHL60.4, MY 7
CDw14	Mo2, MY4, MOP-15, FMC 17
CD15	FMC 10, VIM-D5, DUHL 60.1
CD16	VEP 13
CDw17	T5A7
CD19	anti-B <sub>4</sub>
CD20	anti-B <sub>1</sub>
CD21	anti-B <sub>2</sub>
CD22	SHCL-1, HD6, HD39, 29-110, SJ10-1H11
CD23	PL-13, MNM6, Blast-2
CD24	BA-1
CD25	anti-Tac

Kobay monoklonal antikorunun insana tatbikinde zorluklar vardır, insan hybridomalarının elde edilmesi için yapılan çalışmalarda henüz başarı sağlanamamış olup, alternatif olarak Epstein Barr virüs, B hücresi transformasyonu için kullanılmaya başlanmıştır (Rekombinant DNA tekniği).<sup>(26)</sup>

## LENFOPROLİFERATİF HASTALIKLARIN HÜCRESEL FENOTİPİ

Lenfoid hücreler, farklılaşmalarının ve olgunlaşmalarının herhangi bir safhasında malignleşebilirler ve olgunlaşmalarındaki defekt nedeni ile özellikle gelişmenin durduğu safhaya ait hücre klonlarını oluşturacak şekilde proliferere olabilirler.<sup>(51)</sup> Malign hücreler olgunlaşmalarının durduğu safhadaki normal lenfositlerin sahip oldukları yüzey markırlara sahiptirler. Örneğin KLL hücreleri olgun-B hücrelerinin sahip oldukları yüzey markırlara sahiptirler (Şekil III ).



**ŞEKİL III : Lenfoproliferatif hastalıkların hücresel fenotipi**

Lenfoproliferatif hastalıklar (LPH) genellikle lenfoid ve retikuloendotelial dokudan köken alan, çoğu malign gelişim gösteren, bir kısmı benign görülmekle beraber malign trans-

formasyon gösterebilen değişik hastalıklar grubunu içermektedir. Lenfoid ve retikülo endotelial dokularda başta lenfositler olmak üzere retikülüm hücreleri ve monosit-makrofajlar temel elemanları oluşturur. LPH'in önemli bir bölümü bu hücrelerden köken alır.

LPH, birbirlerinden önemli ölçüde ayrılım göstermelerine karşın; klinik, histopatolojik, immünolojik ve genetik benzerlikleri olan hastalıklardır. Bu hastalıkların büyük çoğunluğunun lenfosit kökenli olmasından dolayı, klinik yönden çoğu kez LPH lenfoid sistemdeki değişikliklerle kendini göstermektedir.

Lenfomalar, kronik lenfositik lösemi (KLL), akut lenfoblastik lösemi (ALL), hairy cell lösemi, plazma hücresi tümörleri (multiple myeloma, ağır zincir hastalıkları, soliter plazmasitoma, Waldenström makroglobulinemisi) gibi malign hastalıklar sınıfına giren çok değişik hastalık grupları dışında, malign olduğu tartışmalı veya "non-malign" bazı hastalıklar da LPH grubuna sokulmaktadır. Bunlardan başlıcaları Castleman hastalığı, sinüs histiyositozisi, benign monoklonal gamapatiler, idiyopatik cold-hemaglutinin hastalığı, immünoproliferatif ince barsak hastalığı, amiloidoz ve enfeksiyöz mononükleoz'dur.

**TABLO V : Lenfoproliferatif hastalıkların immünofenotipi**

T hücre Kökenli
- T-ALL
- Lenfoblastik lenfoma
- Hodgkin- dışı lenfomaların bazıları
- Sezary Sendromu
- Mycosis Fungoides
B hücre kökenli
- ALL (erken preB,pre-B,B)
- Kronik Lenfositik Lösemi
- Waldenström Makroglobülinemisi
- Multipl Myeloma
- Burkitt Lenfoması
- Diğer Lenfositik Lenfomalar
Histiyosit-Monosit Kökenli
- Akut Monositik Lösemi
- Malign Histiyositoz
Tartışmalı olanlar
- Hodgkin Hastalığı

Değişik araştırmacılar lenfoproliferatif hastalıkları farklı biçimlerde sınıflandırmışlardır. Ancak son zamanlarda monoklonal antikorların kullanım alanına girmesi sonucu lenfosit alt grupları hakkında bilgilerin artması ile malign hastalıkları daha çok köken aldıkları hücrelere göre sınıflama eğilimi artmıştır (Tablo V).

## AKUT LÖSEMİ

Akut lösemi, çocukluk çağı malign hastalıkları içinde en sık görülen kanser türü (%35) olup, olgunlaşmamış ve anormal lökositlerin kontrolsüz çoğalmaları sonucu gerek kemik iliği yetersizliği, gerek doku infiltrasyonu nedeni ile yüksek mortalite hızına sahip olan ve sebebi kesin bilinmeyen çok yönlü bir hastalıklar grubudur. Amerika'da insidansı her 100.000 çocukta 3.45 dir. Genellikle 1-5 yıllar arasında ve en sık 3-4 yaşlarda görülür.<sup>(38)</sup>Çocukluk çağı akut lösemi olgularının %78-86 sı akut lenfoblastik (lenfositik) geri kalanı ise non-lenfositiktir.<sup>(42,59)</sup>

**TABLO VI : Akut lösemilerin morfolojik sınıflandırılması**

Boya	Lenfoblast	Miyeloblast	Monoblast	Eritroblast
<b>May-Grünvald-Giemsa</b>				
Hücre büyüklüğü	değişken	regüler	regüler	regüler
Nükleus	yuvarlak	yuvarlak	lobüle	yuvarlak, immatür
Nükleus	yarıklı	irregüler çentikli		
Stoplazma	0-2	2-4	1-3	0-1
	Çok az, bazofilik nadiren vakuollü	orta bazofilik	geniş, gök mavisi	bazofilik
PAS	kaba, granüler (%50)	Belirsiz diffüz veya negatif	negatif	diffüz, kuvvetli pozitif
PEROKSİDAZ	Negatif	pozitif	pozitif	negatif
SUDAN - BLACK B	negatif	pozitif	pozitif	negatif
<b>ESTERAZ</b>				
Naftol AS-D asetat	zayıfça pozitif	pozitif	pozitif	negatif
Fluoride	pozitif	pozitif	negatif	negatif

Akut lösemiler ilk önceleri sadece Romanowsky boyaları (Wright, Wright-Giemsa, May-Grunvald-Giemsa) ile boyanmış kemik iliği yaymalarındaki blast hücrelerinin mor-

folojik karakterleri esas alınarak sınıflandırılırlardı. Son yıllarda akut lösemiler spesifik immünolojik, histokimyasal, biyokimyasal, sitogenetik, ve hücre kinetik karakterleriyle kolaylıkla alt sınıflara ayrılabilirler. Tablo VI'da akut lösemilerin morfolojik ve histokimyasal sınıflandırması gösterilmiştir.

Bugünkü görüşlere göre ALL, klinik özellikler ve prognoz yönünden heterojen bir gruptur. Bu heterojenlik önemli ölçüde lösemik transformasyonun klonal biçimde kaynaklandığı hücre tipi ile ilişkilidir.<sup>(17,21,51)</sup>

#### AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİNİN SINIFLANDIRILMASI :

Günümüzde yapılan morfolojik, histokimyasal, immünolojik ve sitogenetik çalışmalar sonucunda ALL nin çeşitli sınıflandırmaları yapılmıştır.

**FAB sınıflandırılması:** 1976 da Fransız, Amerikan ve İngiliz (FAB) hematologlarının oluşturduğu grup ALL'yi morfolojik kriterlerine göre sınıflandırdılar.<sup>(2)</sup> FAB sınıflandırmasında hücrelerin büyüklüğü, kromatin şekilleri ve biçimleri, nukleus sayıları ve sitoplazmik karakterleri esas alınarak L1, L2, ve L3 olmak üzere üç tip lenfoblast tanımlandı. FAB kriterleri kullanılarak sınıflandırma yapılan serilerde çocuklarda L1-ALL'nin % 63-74, L2-ALL'nin % 12-36, L3-ALL'nin ise %0-4 arasında görüldüğü bildirilmektedir. Hepsi olmasada otörlerden çoğu L1-ALL nin prognozunun daha iyi olduğunu savunmuşlardır.<sup>(42)</sup> Tablo VII'de FAB sınıflandırılması verilmiştir. Hücre membran markırları ile FAB morfolojik kriterleri arasında, L3-morfolojisi ile B-hücreli lösemi/lenfoma hariç bir korelasyon bulunamamıştır.<sup>(14,25,58)</sup>

**TABLO VII : FAB Sınıflandırmasına Göre ALL Alt Gruplarının Özellikleri**

LENFOBLAST	L1	L2	L3
Büyüklük	Küçük	İri, değişken	Büyük
Nukleus	Düzgün	Düzensiz, çentikli	Düzgün
Kromatin	Yoğun	İnce	İnce
Nukleolus	Hiç yok, küçük	Büyük belirgin	Belirgin
Stoplazma	Çok dar.	Daha geniş	Koyu bazofilik
Görülme sıklığı	Sık	Ender	Ender
Prognoz	İyice veya nispeten iyice	Kötü	Kötü

**Histokimyasal Sınıflandırma:** Histokimyasal profil lenfoid lösemiye nonlenfoid lösemilerden ayırt etmede yararlıdır. En yaygın olarak kullanılan sitokimyasal yöntem periodic-acid-Schiff (PAS) reaksiyonudur. PAS,ALL blastlarının %40-70 inde pozitifdir. Ancak PAS pozitifliğinin prognozu tayin etmedeki değeri tartışmalıdır.<sup>(20,56)</sup> PAS pozitifliği ile immünolojik fenotipler arasında bir çalışma hariç hiç bir korelasyon gözlenmemiştir. Asit fosfataz reaksiyonu ALL'nin alt gruplarını tayin etmede daha duyarlıdır. Bu enzim fetal timositlerde bulunur. T-ALL nin %90'ında pozitifdir<sup>(11)</sup>.  $\beta$ -Glukorindase ve  $\alpha$ -naphthyl esteraz reaksiyonları ile de immünolojik fenotipler arasında bir korelasyon kurulamamıştır.<sup>(3)</sup> Sudan Black B reaksiyonu nonlenfositik lösemiye, lenfositik lösemiden ayırt etmede kullanılan faydalı bir yöntemdir.

### ALL'nin İMMUNOLOJİK FENOTİPLERİ

Heterojen bir hastalık olan ALL'nin hücre fenotiplerini belirlemek için çeşitli markırlar kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan ilk markırlar T-ALL alt grubunu (olguların %15-25'i) tanımlayan E-Rozet reseptörleri<sup>(7,61)</sup> ve B-ALL alt grubunu (olguların < %5'i) tanımlayan Smlg'dir.<sup>(44)</sup> Hem B hem de T-ALL alt gruplarının prognozları iyi değildir.<sup>(12)</sup> Bundan sonraki aşamada en önemli buluş, CALLA'ya özgül antiserumların geliştirilmesi ile olmuştur.<sup>(24)</sup> CALLA'ya (common akut lenfoblastik lösemi antijeni) özgül antiserum ilk defa tavşanların, Smlg negatif ve E-Rozet negatif ALL hücreleriyle immünize edilmesiyle üretildi.<sup>(12)</sup> Daha sonraları molekül ağırlığı 100 kd olan bu antijene özgül monoklonal antikorlar geliştirildi. <sup>(49)</sup> CALLA normal periferik kan lenfositlerinde bulunmasına rağmen lösemiye spesifik değildir ve Tdt - pozitif ve Ia pozitif kemik iliği hücrelerinde de gösterilmiştir.<sup>(36,49)</sup> CALLA ayrıca renal tübüler ve glomerüler hücrelerde, meme epitelinde, fetal küçük intestinal epitelyal hücrelerde, granüositlerde, fibroblastlarda ve melanoma hücrelerinde de gösterilmiştir. Yine CALLA Burkitt lenfoma hücrelerinde, foliküler lenfoma hücrelerinde ve lenfoblastik lenfomalı hastaların % 40'ının hücrelerinde de pozitifdir. <sup>(48)</sup> CALLA'ya özgül anti serumların geliştirmesiyle ALL'nin sınıflandırılmasında önemli bir adım daha atıldı. ALL'li hastaların büyük çoğunluğunun non B, non T-ALL olduğu anlaşılırken CALLA'ya özgül antiserumların geliştirilmesiyle bu alt gruptaki hastalar arasında CALLA negatif "sınıflandırılmamış-ALL" ve CALLA pozitif-ALL (common-



ALL) olmak üzere iki alt sınıf daha tanımlandı.<sup>(12)</sup> CALLA pozitif non B, nonT-ALL'nin prognozu hem B-ALL'den hem T-ALL'den hem de "null"-ALL olarak da adlandırılan CALLA negatif nonB, nonT ALL'den daha iyidir.<sup>(17,23)</sup>

Sitoplazmik  $\mu$  ağır zincirinin çalışmasıyla birlikte "pre-B ALL" denilen bir alt grup daha belirlendi.<sup>(66)</sup> Bu alt grupta C $\mu$  pozitifliğinin yanısıra CALLA pozitif non T-ALL'nin bütün yüzey markırları pozitifdir ve bu alt grubun prognozu daha kötüdür.<sup>(16)</sup> Daha önceleri common - ALL diye sınıflandırılan grupta C $\mu$ 'nün negatif olduğu gösterilmiştir. CALLA'nın pozitif, C $\mu$ 'nün negatif olduğu bu grup günümüzde "erken pre - B ALL" olarak sınıflandırılmaktadır. Erken pre - B ALL'nin çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi vakalarının yaklaşık üçte ikisini oluşturduğu ve prognozunun diğerlerine göre daha iyi olduğu bulunmuştur.<sup>(46)</sup> Diğer markırlardan Ia'nın non T-ALL'ye özgül olduğu anlaşılırken non T-ALL'yi T-ALL'den ayırt etmede değerli olduğu anlaşılmıştır.<sup>(21)</sup>

Hücre yüzey antijenlerinden başka intraselüler enzimlerin analizi de ALL sınıflandırılmasında araştırılmıştır. Örneğin bunlardan timositlere özgül olan Tdt enzimi kemik iliğindeki lenfositlerde de düşük oranlarda bulunur. Ancak olgun lenfositlerde bulunmaz. ALL'nin tüm alt sınıflarında gösterildiğinden bu enzimin sınıflandırmada fazla bir yararı yoktur. <sup>(17,23)</sup>

Foon ve arkadaşları ALL'yi 1982'de yayınladıkları raporda 5 alt gruba ayırmışlardı. Bu alt gruplar B-ALL, T-ALL, Pre B-ALL, CALL (common ALL ) ve sınıflandırılmamış ALL şeklinde idi.<sup>(22)</sup> Bu sınıflandırma epidemiyoloji, prognoz ve uygun tedavinin seçimi yönünden önemlidir.

Son zamanlarda immünglobulinlerin gen yapılarına ve B hücre antijenlerine özgül monoklonal antikorlara yönelik çalışmalar non B, non T-ALL vakalarının çoğunun B-hücre kökenli olduğunu göstermiştir.<sup>(31,32,40,41)</sup> Nitekim Foon ve arkadaşları 1986'da yayınladıkları raporda ALL'yi yeniden sınıflandırma yoluna gitmişler ve nonT-ALL ve T-ALL olmak üzere iki ana gruba ayırmışlardır.<sup>(21,23)</sup> Günümüzde bu sınıflandırma yaygın olarak kullanılmakla beraber ALL, lenfoblastların orijinini aldıkları hücre tipine göre de T-ALL, erken pre-B, pre-B ve B-ALL olarak da sınıflandırılabilir.<sup>(17,21,23)</sup>

## Non T-ALL

İki önemli araştırmanın sonucu non T-ALL'nin yeniden değerlendirilmesine yol açtı. Bunlardan birincisi, B hücreye özgül antijenleri belirleyen monoklonal antikörlerin çoğunun non-T ALL lenfoblastlarında mevcut olduğunun gösterilmesi idi. Bu antikörlerin en spesifik muhtemelen anti-B<sub>4</sub>'dü ki, bu markır non T-ALL'li hastaların % 95'inde pozitif bulunmuştur.<sup>(39,40)</sup> İkinci önemli araştırmada ise immunglobulin genlerinin klonal yapılarının incelenmesi ile B-hücre kökenli çoğu vakanın non-T ALL olduğu gösterildi.<sup>(31,32,40)</sup>

Ia antijeninin birçok non T-ALL hücresinde mevcut olmasına ve CALLA'nın non T-ALL hücrelerinin % 75'inde pozitif bulunmasına karşılık bu iki antijen T-ALL olgularının da % 10'unda pozitif bulunmuştur.<sup>(5)</sup> Onun için T-ALL hücrelerinde bulunmayan B-hücreye özgül antijenler (B<sub>1</sub> ve B<sub>4</sub>) non T-ALL'nin sınıflandırılmasında oldukça yararlıdır.<sup>(21,23,30)</sup>

ALL olgularının % 5'inden azında SmIg pozitifdir, bunlar tipik olarak B-ALL olarak sınıflandırılırlar. Bu hücreler genellikle B<sub>1</sub> (CD20), B<sub>4</sub> (CD19) ve Ia'yı içeren diğer B hücre antijenlerine sahiptirler. Çocuklarda B-ALL muhtemelen non Hodgkin veya Burkitt lenfomanın lösemik fazlarıdır. Bir başka non T-ALL alt sınıfını tanımlayan bir diğer markır C<sub>μ</sub> ağır zinciridir. B cell kökenli bir çok non-T-ALL vakasında C<sub>μ</sub> sınıflandırılmayı kolaylaştıran bir markırdır. C<sub>μ</sub> ağır zincirini sentez eden pre-B hücreleri C<sub>μ</sub> ağır zincirini sentez etmeyen erken pre-B hücrelerinden daha olgun, ancak SmIg pozitif olan B hücrelerinden daha az olgundurlar.

Nadler ve arkadaşları son zamanlarda non- T ALL'li 138 olguyu sınıflandırmışlardır.<sup>(39)</sup> Onlar bu olguları 4 alt gruba ayırdılar.

Birinci alt grup olguların % 5'ini içeriyordu ve Ia pozitif. % 15 olgunun bulunduğu ikinci alt grupta Ia ve B<sub>4</sub> antijenleri pozitif. Üçüncü alt grupta olguların 1/3 'ü vardı ki burada Ia, B<sub>4</sub> ve CALLA pozitif. IV. alt grupta ise olguların 1/2'si vardı ve bunlarda Ia, B<sub>4</sub>, CALLA ve B<sub>1</sub> pozitif bulunmuştu.

IV. alt grup daha sonra kendi arasında C<sub>μ</sub> bulunup bulunmadığına göre iki ayrı alt gruba daha bölündü. C<sub>μ</sub> 'nin pozitif olduğu grup V. alt grup olarak da sınıflandırılmaktadır. Son olarak VI. alt grupta ise SmIg pozitif B-ALL'li olgular vardı Tablo VIII'de non T-ALL'nin

sınıflandırılması verilmiştir.

Aynı araştışıcılar II.III. ve IV. gruptaki tüm olguların gen yapılarını da incelediler. II. gruptaki olgularda (Ia ve B4 pozitif olanlar) ağır zincir gen germ taslakları ile birlikte  $\kappa$  ve  $\lambda$  hafif zincir genlerinin de bulunduğunu, III. grupta ise ağır zincir gen yapısının yanında  $\kappa$  hafif zincir gen yapısını; IV. grupta ise ağır zincir gen yapısı yanında bu gruptaki dört olgunun ikisinde sadece  $\lambda$  zincir delesyonunun bulunduğunu gösterdiler. Ancak gerek B-hücre gerek T-hücre kökenli olguların her ikisinde de ağır ve hafif zincirlerin birlikte bulunmasından dolayı immünglobulin gen yapılarının incelenmesi ile hücrelerin T veya B kökenli olduğu kesin olarak ayırt edilememektedir. Bu yüzden Nadler ve arkadaşları ayırımında B<sub>4</sub> markırının kullanılmasının daha iyi sonuç verdiğini savunmaktadırlar. (39,40)

TABLO VIII : Non-T - ALL'nin Sınıflandırılması						
A n t i j e n l e r						
GRUP	Ia	B4	CALLA	B1	Stoplazmik $\mu$	SmIg
I	+	-	-	-	-	-
II	+	+	-	-	-	-
III	+	+	+	-	-	-
IV	+	+	+	+	-	-
V	+	+	+	+	+	-
VI	+	+	+/-	+	-	+

Sonuç olarak, Non T-ALL alt sınıflarının B-hücresinin farklılaşma safhaları ile paralellik gösterdiği anlaşılmıştır. Sadece Ia (+) olan I. grup B hücrelerinin farklılaşmasındaki erken safhaya denk gelir. Bundan sonraki safhalarda sırasıyla B<sub>4</sub> ve CALLA antijenleri kazanılırken II. ve III. grup non T-ALL meydana gelir. IV. grupta B<sub>1</sub> antijeni de kazanılmıştır. Bunu daha sonra V. ve VI. gruplarda sırasıyla C<sub>1</sub>g ve SmIg'nin belirmesi takip eder. (Şekil IV).

## T-ALL

ALL olgularının % 15-25'i T-ALL 'dir. T-ALL'nin klinik özellikleri arasında yüksek blast sayımı, erkeklerde ve yaşlılarda daha sık görülmesi, mediastinal kitlelere ve santral sinir sistemi lösemisine daha sık rastlanması sayılabilir. (17,23,45,57) T-ALL 'li çocukların prognozu B-hücresinin öncülerinden köken alan ALL'li çocuklara göre daha kötüdür.(46)

T-ALL'deki lenfoblastlar koyun eritrositleri ile rozet oluştururlar. T-ALL'li hastaların yaklaşık 1/2-1/3'ü E-rozet oluşturmazken Leu-1 ve Leu-9 antijenleri ile reaksiyon verdikleri görülmüştür.(4,43,52) T-ALL'nin belirlenmesindeki en hassas markır pan-T 40 kd.dir (anti-Leu9; CD7). Bu antijen timositlerin ve T-hücrelerinin çoğunun yüzeyinde bulunmasına rağmen non-T-ALL veya B-ALL ve lenfomalarda bulunmaz. Reinherz ve arkadaşları T-ALL'li 23 hastada yaptıkları bir çalışmada olguların hepsinde de Leu-9 antijeni pozitif bulmuşlardır. Daha önceleri anti Leu-1 (CD5) T-ALL için en hassas markır olarak kabul edilirdi; fakat Reinherz ve arkadaşları bu çalışmada CD7'yi tüm T-ALL li hastalarda pozitif bulurlarken CD5'i üç hastada negatif bulmuşlardır.(47)

T-ALL'nin alt gruplarının sınıflandırılması karışıktır. Reinherz T-ALL'yi timik farklılaşma evrelerine göre üç alt sınıfa ayırmıştır.

EVRE I Timositleri, en primitif timositlerdir (pretimositler). T9 ve T10 antikorları ile reaksiyona girerler ve timik hücrelerin yaklaşık %10'u bu evrededir. Reinherz ve arkadaşları T-ALL hücre antijenlerinin çoğunun erken timositlerde bulunduğunu bildirmişlerdir.(47)

Timik farklılaşmanın bir sonraki evresi timositlerin çoğunluğunu içerir ve bu safha Evre II veya "ara timositler" olarak isimlendirilir. Bu hücrelerde T9 kaybolur, T10 halen vardır ve T6 (CD1) T4 (CD4) ve T8 (CD8) antijenleri kazanılmıştır. T-ALL olgularının % 20'si bu fenotipi göstermektedir.

Olgunlaşmanın son safhası olan Evre III de matür timositler artık T6 içermezler. Ancak periferik kandaki T-lenfositler gibi T4 ve T8 alt sınıflarına bölünürler. T-ALL hücreleri nadiren olgun timosit fenotipi gösterirler. Sadece Reinherz ve arkadaşları olgun timosit fenotipi özelliğinde T-ALL hücrelerini bulmuşlardır. Daha yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada ise

Roper ve arkadaşları Reinherz ve arkadaşlarının çalışmasına benzer bulguları bulurlarken bazı major farkları da rapor ettiler.<sup>(52)</sup> Bu çalışmada, T-All 'li hastaların sadece üçte biri timositlerin erken veya evre I fenotipini gösterirken geri kalan çoğunluğu timositlerin II. ve III. evre özelliğini gösteriyorlardı. Tablo IX'da T-ALL'nin sınıflandırılması gösterilmiştir.

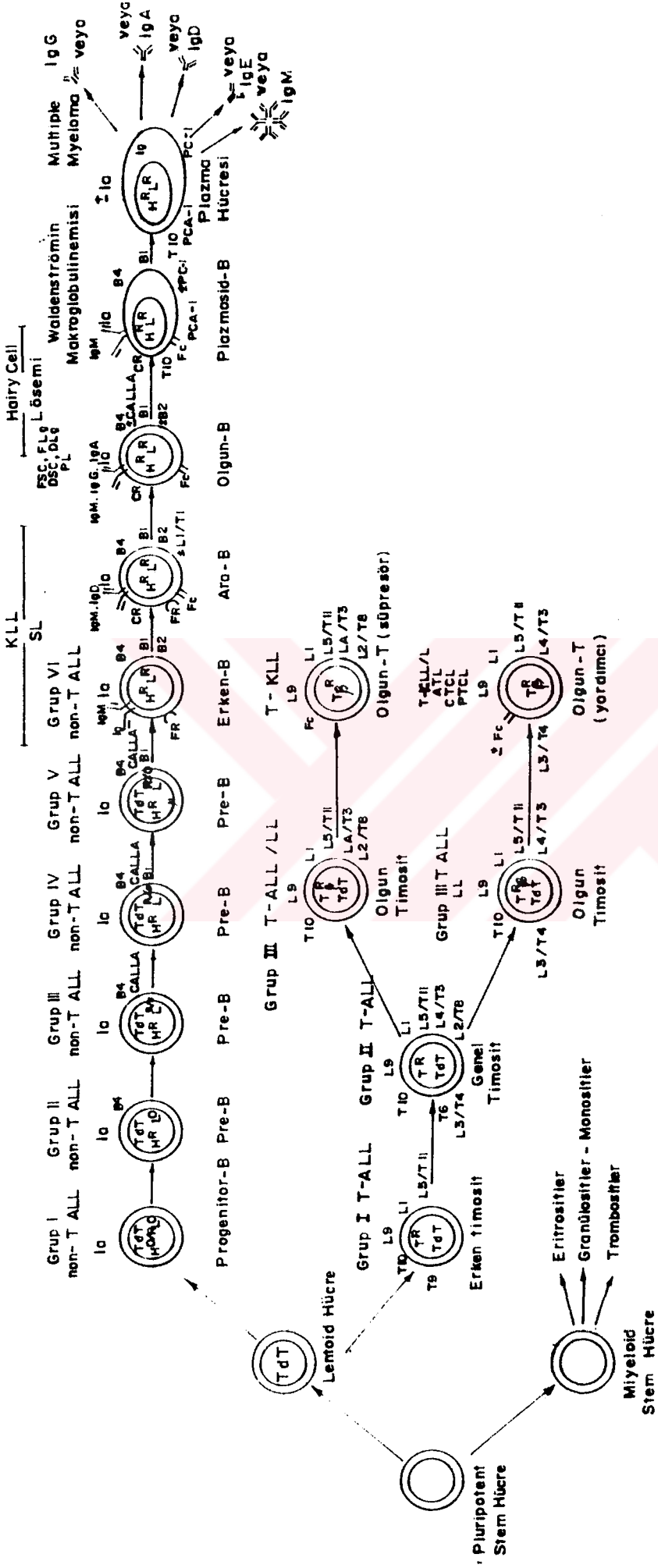
TABLO IX : T-ALL'nin SINIFLANDIRILMASI							
A n t i j e n l e r							
GRUP	Leu-9	Leu-1	T11-Leu5	T3-Leu4	T4	T8	T6
I	+	+ (% 90)	+ (% 75)	-	-	-	-
II	+	+	+	+ (%25)	+ (% 90)	+ (% 90)	+
III	+	+	+	+	+/-	+/-	-

Leu-9 bütün alt gruplarda pozitif olan markırdır. Hücrelerin hemen tamamına yakınında (%90) Leu-1 antijeni pozitifdir. Yine hücrelerin çoğunda (% 75) inde koyun eritrositleri reseptörlerini belirleyen T11-Leu 5 (CD2) bulunur.

I. alt gruptaki hücrelerde ayrıca T9 ve/veya T10 mevcuttur. Daha matür bir antijen olan T3 (CD3) birinci gruptaki hücrelerde bulunmaz. T4 (yardımcı-T) antijeni, T8 (baskılayıcı-T) antijeni ve T6 antijeni grup I'deki hücrelerde bulunmazlar.

Sınıflandırmanın bir sonraki basamağı II. gruptur. T9 bazı hücrelerde bulunur, ancak T6 antijeni ile simultane olarak T4 ve T8 antijenlerinin bulunması grup II'yi I'den ayırır. II. gruptaki bazı hücrelerde T3 bulunabilir. III. gruptaki T-ALL hücreleri T6 antijenlerini kaybederler ve olgun timositlerin ve T-lenfositlerinin fenotipine doğru farklılaşırlar (T3, T4 veya T3, T8).

Roper ve arkadaşları T-ALL'nin bu üç grubundaki olguların klinik korelasyonlarını yapmışlar ancak üç grup arasında klinik bulgular, remisyon süresi veya yaşam süresi ile ilişkili bir fark bulamamışlardır. Ancak gruplarındaki olgu sayıları istatistiksel çalışma için yeterli değildi. T-ALL'nin sınıflandırılmasında bu sistemin kullanılması ile bir çok enstitünün elde ettiği verilerin toplanmasıyla alt gruplar arası klinik bir korelasyonun yapılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.<sup>(17,21,23,47,52)</sup>



**Şekil IV: İnsan lenfoid hücrelerinin farklılaşmasının ve bunların malignensilerle olan ilişkisinin şematik açıklaması:** ALL : Akut lenfoblastik lösemi; KLL : Kronik lenfoid lösemi; SL: Küçük lenfositik malign lenfoma; FSC : Foliküler küçük yank hücreli malign lenfoma; FLg: Foliküler geniş hücreli malign lenfoma; DSC : Diffüz küçük yank hücreli malign lenfoma; DLg : Diffüz geniş hücreli malign lenfoma; PL : Promiyositik lösemi; LL: Lenfoblastik lenfoma; ATL : Erişkin T hücreli lösemi/lenfoma; CTCL : Kutaneus T hücreli lenfoma; PTCL : Periferik T hücreli lenfoma; Tdt: Terminal deoxynucleotidyl transferaze; H : Ağır zincir; L : Hafif zincir; O: Gen taşı; R: Gen yapısı; T<sub>H</sub> : T<sub>H</sub> reseptörü klonal yapılanması; FR : Fare reseptörü; CR : Kompleman reseptörü.

## M A T E R Y A L v e M E T O D

### I) HASTALARIN SEÇİMİ

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji -Onkoloji kliniğine Nisan 1989 - Nisan 1990 tarihleri arasında ilk defa müracaat eden ve yeni teşhis edilmiş yaşları 10 ay ile 14 yaş arasında değişen (ort:  $8,0\pm 4,1$ ) 11'i erkek 20 akut lenfoblastik lösemi (ALL) olgusu çalışma grubunu oluşturmuştur.

Çalışma grubuna dahil edilen hastalara daha önce herhangi bir tedavi başlanmamıştı ve kan transfüzyonu yapılmamıştı. Tüm hastalardan öykü alındıktan sonra dikkatli fizik muayeneleri yapıldı; karaciğer, lenfadenopati ve dalak büyüklükleri kaydedildi. Hct, BK, trombosit sayımları ve periferik yaymaları standart metodlarla yapıldı. <sup>(64)</sup> Kemik iliği aspirasyon materyalleri ve periferik yaymaları önce Wright-Giemsa ile boyandı ve lenfoblast yüzdesi hesaplandı. Kemik iliğinde % 25 veya daha fazla lenfoblast saptanması tanı kriteri olarak alındı. Non lenfositik lösemilerden ayırmak için ayrıca kemik iliği aspirasyon materyalleri PAS, Sudan Black, peroksidoz, alfa - naphthyl esteraz ve asit fosfotaz boyaları ile boyandı. <sup>(10,11)</sup>

Tüm hastaların akciğer ve yan mediasten grafileri çekilerek mediastinel kitlelerinin olup olmadığı araştırıldı. Şüpheli mediastinel kitlesi olan olgular CT ile incelendi. Ayrıca tüm olgularda karaciğer fonksiyon testleri (SGOT,SGPT, Alkalin fosfataz, total bilirubin, direk bilirubin, total protein, albumin, globulin ve protein elektroforezi) ve böbrek fonksiyon testleri (tam idrar tetkiki, BUN, elektrolit, kreatin, urik asit) ile kan, idrar, boğaz ve gaitanın mikrobiolojik incelemeleri rutin olarak yapıldı.

### II. KONTROL GRUBUNUN SEÇİMİ:

Hücre yüzey markırları çalışmalarının sonuçlarını teyid etmek için yaşları 4 ile 13 yaş arasında değişen (ort:  $8,3\pm 2,8$ ) 10'u erkek yirmi sağlıklı kontrolün hücre yüzey markırları incelendi. Kontrol grubu olarak seçilen ve olgularımızla aynı yaş grubunda olan sağlıklı çocukların seçiminde alınan öykü ve yapılan fizik muayeneleri sırasında herhangi bir allerjik, enfeksiyöz ya da çalışmayı etkileyecek herhangi bir hastalık geçirmemiş olmalarına dikkat edildi.

### III. LENFOSİT HÜCRE YÜZEY MARKIRLARININ İNCELENMESİ

#### A) Kanların alınması<sup>(53)</sup>

*Kullanılan malzeme :*

1. Heparin : Liqueimine<sup>R</sup> Roche- flacon, 5 ml.
2. Steril disposable enjektör ve iğne
3. Alkollü pamuk ve turnike.

Sabah saat 8.00-10.00 arası enjektöre 0.1 cc heparin çekilerek üzerine ante-cubital venden 10 cc kan alındı. Alınan kanlar iki saat içinde çalışıldı.

#### B) Mononükleer hücrelerin Ayrılması<sup>(6)</sup>

*Kullanılan Malzeme :*

1. Ficoll-hypaque : Histopaque<sup>R</sup> 1077-1, Sigma
2. PBS (10x) : Phosphate-buffered-saline (pH:7.2)  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 gr.  
KCl 2 gr.  
NaCl 80 gr.  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 17.8 gr.

Bu karışım 1 lt. distile suda eritilip % 1 Na N<sub>3</sub> (sodyum azide) ilave edildi. Bu stoktan 1:10 oranında serum fizyolojik ile sulandırarak kullanıldı.

3. Lökosit solüsyonu: 97 ml.distile su + 3 ml.glasial asetik asit.
4. Pastör pipetleri
5. 40 cc. hacimli yuvarlak dipli cam tüpler.
6. 50 cc. hacimli konik dipli plastik tüpler.
7. 12 cc. hacimli plastik tüpler.
8. Cam pipetler
9. Lökosit pipeti
10. Hemositometre
11. Steril disposable enjektör ve iğne.



**Metod:**

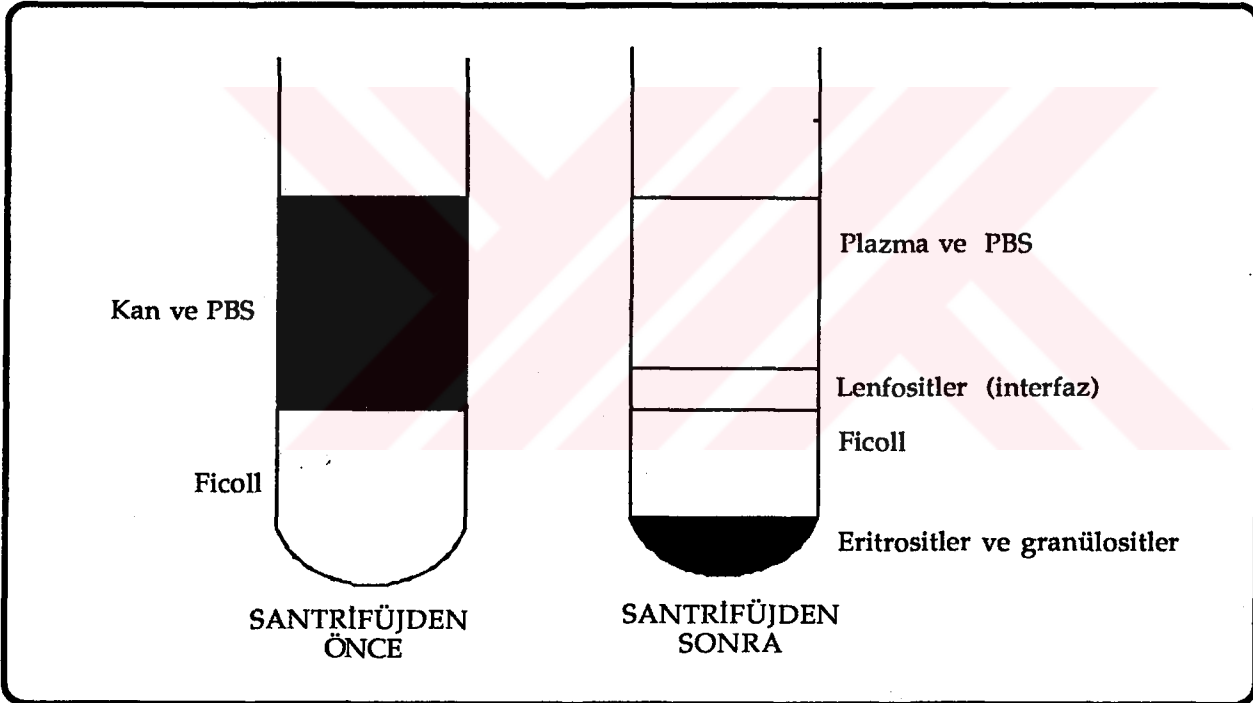
a) Alınan 10 cc heparinize periferik kan plastik tüpe boşaltılarak 1:3 oranında PBS ile sulandırıldı.

b) Enjektöre 3 ml. ficoll-hypaque alınarak cam bir tüpe boşaltıldı.

c) Sulandırılmış olan kan, pastör pipeti ile yavaşca ficoll-hypaque üzerine yayıldı.

Bu işlem için önce bir damla kan, pastör pipeti ile tüpün kenarından bırakıldı. Bu bir damla kanın açtığı yol kullanılarak kalan kan ficoll'ün üzerine yayıldı.

d) 1350 rpm de 35 dk. 22°C de santrifüj edildi.



**ŞEKİL V : Ficoll - hypaque gradientinde lenfositlerin ayırımı.**

e) Santrifüj sonunda lenfositler ince bir tabaka olarak interfazda ficoll'ün üzerinde kaldı; ficoll'ün altında ise eritrositler ve diğer parçalı elemanlar toplandı. (Şekil V) Pastör pipeti ile çok dikkatli olarak ficoll'süz lenfositler alındı.

f) Alınan lenfositler plastik bir tüpe konularak, üzerine PBS eklendi. 4°C de 20 dakika 1350 rpm'de santrifüj edildi.

h) Santrifüjden sonra süpernatant atılarak, tekrar PBS eklendi. Pastör pipeti ile tam homojen bir karışım sağlandıktan sonra hücre sayımına geçildi.

ı) Sayım için, hemositometrenin pipetine 0.5 cc işaretine kadar lenfosit süspansiyonundan, 1.1 işaretine kadar da lökosit solüsyonundan çekildi. Pipetin iki ucundan baş ve orta parmaklarla tutularak karıştırıldı. İlk iki üç damla dışarıya atıldı.

i) Hemositometrenin her iki alanına birer damla lenfosit süspansiyonundan damlatıldı.

j) Dört köşedeki lenfositler sayılarak 0.05 ile çarpıldı. Böylece lenfosit sayısı  $\times 10^6$ /ml olarak bulundu.

k) 1 ml de elde edilen hücre sayısını 2 milyon olacak şekilde ayarlamak gerektiğinde elde edilen sayı ikiye bölünerek kaç cc hacim sağlanması gerektiği hesaplandı.

Örneğin 8 milyon/ml hücre elde edilmişse  $8 \times 10^6 : 2 = 4$  ml total hacim sağlanmalıdır. Bunun için tüpe 3 ml daha PBS solüsyonu eklenmesi gerekir.

### C) E-Rozet Testi (29)

#### Kullanılan Malzeme:

Lenfosit ayırımı için gerekli olanlara ek olarak:

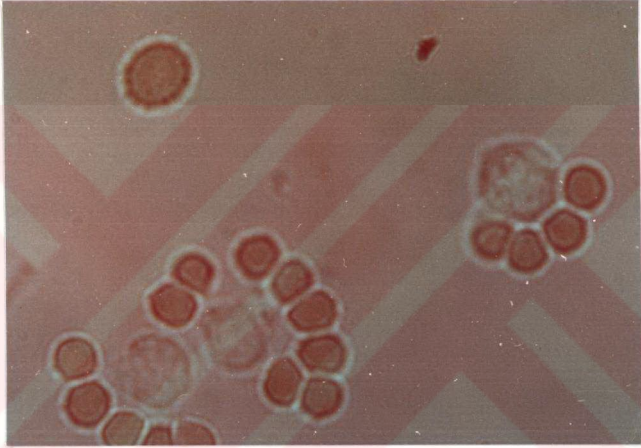
1) Fetal buzağı serumu (Fetal Calf Serum-FCS Sigma)

Liyofilize FCS steril distile su ile sulandırıldıktan sonra 56 C° de 30 dakika su banyosunda tutularak komplemanın inaktivasyonu sağlandı. Kullanılana kadar -24 C° de saklandı.

2) Koyun Eritrositleri (Sheep red blood cells-SRBC ) 10 cc heparize koyun kanı alınarak 20 cc Alsever solüsyonu içinde muhafaza edildi, en geç yedi gün içinde kullanıldı. 7 gün sonra yeniden kan alındı. Çalışma günü, bu stoktan alınan örnek, alseverden arındırmak için PBS ile yıkandı. Üstteki kısım atılarak yeniden, PBS eklendi. Buradan alınan örneklerden PBS ile önce %5 lik SRBC süspansiyonu, daha sonra %0,5 lik SRBL süspansiyonu hazırlandı. E-rozet testinde %0,5 lik SRBC süspansiyonundan kullanıldı.

*Metod:*

- a)  $2 \times 10^6$  /ml. olarak hazırlanan lenfositlerden küçük pastik bir tüpe 0,5 cc konulup, üzerine %0,5 lik koyun eritrositleri süspansiyonundan 0,5 cc. eklendi.
- b) Bu karışım üzerine 0,1 cc FCS ilave edilerek, hafifçe karışması sağlandı.  $37^0\text{C}$  de 15 dakika su banyosunda inkübe edildi.
- c) Inkübasyonun sonunda,  $22^0\text{C}$  de 850 rpm de 5-10 dk. santrifüj edildi.



**Resim I : E-Rozet pozitif lenfoblastlar**

d) Bu süspansiyondan pastör pipeti ile hemositemetrenin her iki alanına birer damla damlatılarak, Faz-Kontrast ışık mikroskopunda sayım işlemine geçildi.

e) En az üç koyun eritrositi ile rozet oluşturan hücreler E-rozet pozitif olarak değerlendirildi. İki defa 100'er hücre sayılarak ortalaması alındı. Rozetler % olarak ifade edildi. ResimI.de E-rozet formasyonuna ait fotoğraf gösterilmiştir.

*Değerlendirme:*

Hastalarda en az %20 rozet teşekkül eden blast hücresi sayıldı ise E-rozet testi pozitif kabul edildi ve blastların T-hücresi kökenli olduğuna karar verildi. <sup>(29)</sup>

### D) Yüzey immünoglobulin (SmIg) testi. (15)

B-Lenfositlerinin incelenmesinde direk immünfloresans yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle, B lenfosit membran yüzeyinde bulunan immünglobulinlerin Fluorescein ile işaretli anti-insan immunglobulini (Ig/IgG + IgA + IgM) kullanılarak gösterilmesi esasına dayanır.

#### Kullanılan malzeme:

1. Media : Medium 199 (10x) (Gibco Ltd.Europe) dan 10 cc, 90 cc distile su ile 100 cc'ye tamamlandı. Karıştırma işlemi yapıldıktan sonra 20 cc'si dışarı atıldı. Yerine 20 cc. inaktive edilmiş FCS ilave edildi. Ayrıca karışıma bakteri üremesini önlemek amacı ile 100 mg. Sodyum azit konuldu. (PH:7.2-7.4)

2. Antiserum to Human Ig (/IgG+IgA+IgM)-FITC (Behring Diagnostics) (H+L Chains)

1 cc. steril distile suda tüberkülin enjektörü kullanılarak çözüldü. Hazırlanan karışım ışık görmeyecek şekilde +4 °C 'de aliminyum foile sarılarak saklandı.

3. PBS-Glycerol : 0.1 cc gliserol, 0.9 cc distile su ile vorteks edilerek tam olarak karıştırıldı.

#### Metod:

a)  $2 \times 10^6$  /cc olarak hazırlanan lenfosit süspansiyonundan, 1 cc küçük plastik tüpe konuldu, iki kez media ile 4 °C 'de 1000 RPM'de 10 dakika yıkandı.

b) Son yıkamadan sonra süpernatant atılarak hücrelerin üzerine mikro pipetle 100  $\mu$ l (0.1 cc) media eklendi. Pastör pipeti ile hücre süspansiyonu homojen hale getirildi.

c) Daha sonra bu karışıma 100  $\mu$ l (0.1 cc) FITC anti-insan Ig eklendi.

d) Tüp sallanarak iyice karıştırıldı, 4 °C 'de 30 dakika inkübe edildi.

e) İnkübasyondan sonra bu karışım 3 cc media ile 4 °C'de 1000 RPM 'de 10 dakika olmak üzere 3 kez yıkandı.

f) Son yıkamadan sonra süpernatant atılarak hücreler 100  $\mu$ l (0.1 cc) media içinde pastör pipeti ile süspansiyon haline getirildi.

g) Hazırlanan lamların ortasına 1 damla hücre süspansiyonu damlatılarak yuvar-

lak dipli bir tüple dikkatlice yayılması sağlandı. Yaklaşık 1 cm çapında bir daire oluşturuldu.

h) Yapılan yayma hava teması ile kurutuldu.

i) Preparat, içinde absöü etanol olan coplin jar'a yerleştirildi. 5 dakika sonra çıkarılarak kurutmaya bırakıldı. 2-3 kez PBS ile yıkandı.

i) Hava teması ile kurutuldu. Hücrelerin üzerine 1 damla PBS-Glyserol damlatılarak, üstlerine lamel kapatıldı. (Bu işlem sırasında hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilmelidir.)

j) Lamelin kenarları hava geçirmeyecek şekilde tırnak cilası ile kapatıldı.

k) Kurutulduktan sonra, incelenene kadar 4 °C de karanlık bir ortamda muhafaza edildi.

1) Hücre sayımı için immünflonesans Mikroskopta(Ortophane-Leitz) floresans filtrede (16x100 ) ve normal ışııkta 200 hücre sayıldı. Yüzey floresanı pozitif olan hücreler tesbit edildi ve yüzde olarak ifade edildi. (% Smlg<sup>+</sup> hücreler)

#### E) Monoklonal Antikorlara Hücre Yüzey Antijenlerinin İncelenmesi :<sup>(47)</sup>

Bu çalışmada Monoklonal Antikor tekniğı ile hücre yüzey antijenleri incelenmiştir.

##### Kullanılan Malzeme:

##### 1. Monoklonal Antikorlar (MoAb)

Bütün monoklonal antikorlar stoktan 1:10 dilue edilerek kullanıldı. Dilüsyon için %1 sığır serum albümini (Albimün Bovine -Sigma), %1 Na Azid ve Dulbecco-PBS içeren bir medium kullanıldı. 0,1 cc. stok MoAb 0,9 cc mediumla dilue edildi.

Tablo X'da çalışmada kullanılan MoAb'lar ve özellikleri belirtilmiştir.

##### 2. Dulbecco PBS+FCS (%10FCS)

Dulbecco PBS : 8gr. NACI

370 mgr. KCI

1150mgr. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

200mgr. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Bu karışım 1000 cc. distile suda eritilerek 1mgr.  $\text{NaN}_3$  ilave edildi.%10FCS eklene-  
rek %10 FCS-Dulbecco PBS hazırlanmış oldu.

3. Anti-Mouse IgG (whole molecule) FITC CONJUGATE (Sigma, product no.F  
2883) Florescein isothiocyanate (FITC) ile işaretli anti-mouse Ig serumu. 10x şeklinde konsantre  
edilen antiserum 4 °C de ve koyu renkli bir şişede ışıktan korunarak saklanmıştır. Deneyin  
yapılacağı gün 10 kez (1:10) Dulbecco-PBS ile dilue edilerek kullanılmıştır.

*Metod:*

a) Daha önce anlatılan yöntemle elde edilen lenfositlerden sayım yapıldıktan son-  
ra 1 cc de  $1 \times 10^6$  lenfosit olacak şekilde süspansiyon hazırlandı.

b) Kullanılacak monoklonal antikör sayısı kadar, küçük plastik tüplere hücre  
süspansiyonundan 0,05 'er ml (50 $\mu$ l) otomatik pipetle dağıtıldı.

c) Tüpler işaretlendikten sonra herbirine daha önceden hazırlanan monoklonal  
antikörlardan 0,05 'er ml (50 $\mu$ l) ilave edildi.

e) İki defa 10 dakika olmak üzere 2000 RPM de %10 FCS içeren Dulbecco PBS ile  
yıkandı.

f) Son yıkamadan sonra hücrelerin üzerine 0,05 ml Dulbecco PBS+%10 FCS ilave  
edildi.

g) Karışım homojen hale getirildikten sonra, tüplerin üzerine 0,1 ml (100  $\mu$ l) 1:10  
dilüe edilmiş Anti-mouse FITC eklendi.

h) Tüpler sallanarak karıştırıldı ve 4<sup>0</sup>C'de 1 saat inkübe edildi inkübasyon  
sirasında ara sıra sallayarak karışması sağlandı.

i) Son inkübasyondan sonra hücre süspansiyonu Dulbecco PBS+%10 FCS ile 2 defa  
10 dakika olmak üzere 4<sup>0</sup>C'de 2000 RPM de yıkandı.

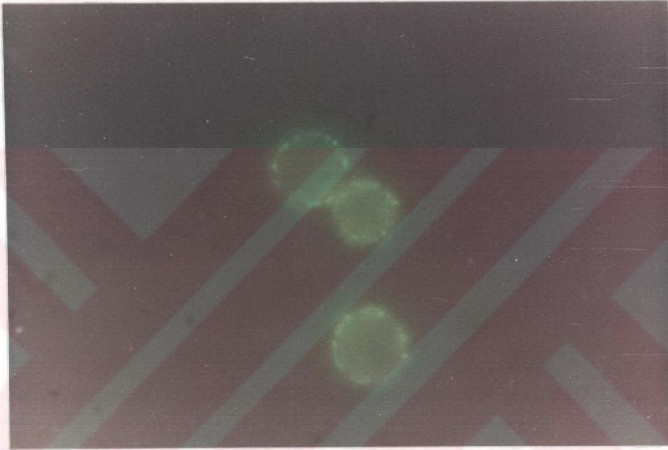
i) Yıkamadan sonra hücrelerin üzerine 0.05 ml Dulbecco PBS+%10 FCS ilave edil-  
di.

j) Karışım homojen hale getirildikten sonra önceden işaretlenmiş lamların  
üzerine tüplerdeki hücre solüsyonundan bir damla konularak yüzey immünfloresans  
yönteminde anlatılan şekilde preparat hazırlandı.

**TABLO X : BU ÇALIŞMADA KULLANILAN MONOKLONAL ANTİKORLAR**

CD	Ticari Kodu	Özellik, (İg Sınıfı), klon.	Pozitif Reaksiyon verdiği hücreler
CD3	BMA030	Pan T-lenfosit (İgG1), BW 264 / 56 Anti-T3	- Periferik kan lenfositlerinin % 75±7'si - E-Rozet pozitif periferik kan lenfositlerinin % 80±95'i - Timositlerin % 65-85'i
CD4	BMA040	Yardımcı T-lenfosit (İgG1), T321 Anti-T4	- Periferik kan lenfositlerin % 45±10'u - Timositlerin % 80-85'i
CD8	BMA081	Baskılayıcı T lenfosit (İgG2a), BW 135/80 Anti - T8	- Periferik kan lenfositlerinin % 28 ±9'u - Timositlerin % 60-85'i
CD19	BMA130	Pan B-lenfosit (İgG1), HD37 Anti-B <sub>4</sub>	- Periferik kan lenfositlerinin yaklaşık % 10'u - E-Rozet negatif kemik iliği hücrelerinin % 98±1'i
CD10	BMA150	CALLA-spesifik (İgM), VIL-A1 Anti-CALLA	- Non T-ALL'li hastaların % 70'inin lösemik hücrelerinde - Blast krizleri sırasında KML'li hastaların % 30'unda - T-ALL'li hastaların yaklaşık % 10'unda - T-ALL'li lenfoblastik lenfomalı hastaların % 40'ında - Burkitt lenfomalı hastaların çoğunda - Nodüler iyi diferansiyel lenfomalı hastaların çoğunda
	BMA020	Ia DR (İgG1), KOR-Ia 17 Anti - HLA DR	- Class II antijen spesifik - Periferik kan lenfositlerinin % 11±4'ü - B lenfositleri, monositler-i makrofajlar, aktive T hücreleri, timik epitel, dalak ve lenf nodularının B hücre alanlarıyla ve B lenfomalılarla reaksiyona girer.

k) İmmünfloresans mikroskopta değerlendirilen hücrelerden önce faz kısmında toplam 200 hücre sayıldı. Bu hücrelerden floresan veren hücrelerin sayısı belirlenerek % olarak ifade edildi. Resim II'de pan T monoklonal antikoruna ile reaksiyona giren floresan pozitif hücreler görülmektedir.



**Resim II : İmmünfloresans mikroskopta floresan pozitif T lenfositlerin görünüşü**

*Değerlendirme:*

Monoklonal antikorlarla hücre yüzey antijenlerinin incelenmesinde floresan pozitif hücrelerin % 10'un üzerinde sayılması pozitif olarak kabul edildi. (30)

*F) İstatistiksel Yöntemler (60)*

Sağlıklı kontrol grubunda ve akut lenfoblastik lösemi olgularında periferik kan hücre yüzey markıklarının aritmetik ortalamaları ve  $\pm 2$  SD'ları hesaplandı.

Hücre yüzey markıklarının incelenmesi ile T-ALL ve non T-ALL olmak üzere iki major gruba ayrılan hastalar arasında yaş; cinsiyet; beyaz küre ve trombosit sayımı; Hct değeri; ka-



raciğer ve dalak büyüklükleri ve L1,L2 FAB morfolojik kriterleri bakımından istatistiksel fark olup olmadığına bakıldı.

Cinsiyet ve L1,L2 FAB kriterleri bakımından iki grup "Fisher-Exact Testi" ile karşılaştırıldı. Özellikle T-ALL grubunu oluşturan olgu sayısının az olmasından dolayı yaş; beyaz küre, Hct, trombosit değerleri ve karaciğer ve dalak büyüklükleri bakımından iki grup "Mann-Whitney-U testi" ile karşılaştırıldı.



## B U L G U L A R

### I) AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ (ALL) OLGULARI :

Yaşları 10 ay ile 14 yaş arasında değişen (ort:  $8.00 \pm 4.17$ ) 11'i erkek 20 ALL'li olgusunun hastalıklarının başlangıçlarındaki klinik ve laboratuvar bulguları (yaş, cinsiyet farkı; Hct, Bk, Trombosit sayımları; karaciğer, dalak büyüklükleri) ve FAB morfolojik kriterleri tablo XI'de gösterilmiştir.

E-rozet , SmIlg, immunfloresan testi ve monoklonal antikorlar kullanılarak periferik kan hücre yüzey antijenleri incelenen ALL olgularının sonuçları tablo XII'de gösterilmiştir.

ALL olgularının immünolojik fenotipleri Foon ve arkadaşlarının 1986'da yaptığı tasnife göre belirlenmiştir.

Çalışmaya dahil edilen tüm olgularımız içinde altısının (1-6. olgular) T-ALL immünofenotipi gösterdiği tesbit edilmiştir. T3,T4 ve T8 bu olguların hepsinde, E-rozet testi dördünde, Ia ise birinde pozitif bulunmuştur. Bu 6 olguda SmIlg, CALLA ve B<sub>4</sub> negatif bulunmuştur.

Geri kalan 14 olgunun (7-20. olgular) hepsinde E-rozet, T3,T4,T8 negatif bulunurken; Ia antijeni hepsinde, B4 biri hariç hepsinde, CALLA sekizinde, ve SmIlg ikisinde pozitif bulundu. Non T-ALL olarak sınıflandırılan bu olgular daha alt gruplara da sınıflandırıldı.

Yedinci olguda markırlardan sadece Ia pozitif bulunduğu için bu olgunun lenfoblastlarının B-hücrelerinin en erken farklılaşma safhasından köken aldığı düşünülmüştür. Daha önceleri sınıflandırılmayan-ALL olarak kabul edilen bu olgu yeni tasnife göre grup I, non T-ALL olarak sınıflandırmaya dahil edilmiştir.

8,9 ve 10. olgularda Ia'nın yanısıra B<sub>4</sub> de pozitif olduğundan lenfoblastların B-hücrelerinin ikinci farklılaşma safhasından proliferere olduğu ve henüz CALLA antijenini kazanmadıkları anlaşılmış ve grup II, non T-ALL olarak sınıflandırılmıştır.

**TABLO XI : AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ OLGULARININ HASTALIKLARININ BAŞLANGIÇLARINDAKİ KLİNİK VE LABORATUAR BULGULARI**

Sıra No	İsim	Yaş	Cins	Hct %	B.K ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Trombosit ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	P.Y'de Blast (%)	Karaciğer (cm)	Dalak (cm)	FAB Sınıflandırması	İmmünofenotip
1	G.S	14	E	28	886.0	40.0	96	5	10	L <sub>1</sub>	T-ALL
2	H.D	14	K	17	72.6	30.0	85	8	9	L <sub>2</sub>	T-ALL
3	Y.A	14	K	18	110.0	70.0	80	6	7	L <sub>1</sub>	T-ALL
4	C.A	12	E	28	96.0	30.0	100	2	NP	L <sub>2</sub>	T-ALL
5	H.H	6.5	E	28	530.0	90.0	98	6	10	L <sub>1</sub>	T-ALL
6	H.K	10	K	23	1016.0	10.0	90	7	8	L <sub>1</sub>	T-ALL
7	E.D	13	K	23	12.2	20.0	92	7	5	L <sub>1</sub>	Grup I Non T-ALL
8	M.Z	1.5	K	20	6.1	10.0	55	3	3	L <sub>2</sub>	Grup II Non T-ALL
9	M.A	2.5	K	27	8.4	10.0	40	NP	NP	L <sub>1</sub>	Grup II Non T-ALL
10	M.B	10 ay	E	35	204.0	15.0	92	6	5	L <sub>1</sub>	Grup II Non T-ALL
11	A.Y	9	E	29	16.0	110.0	60	2	6	L <sub>2</sub>	Grup III,IV,V Non T-ALL
12	M.T	6	E	20	5.4	80.0	42	7	NP	L <sub>2</sub>	Grup III,IV,V Non T-ALL
13	M.Ç	10	E	31	7.8	90.0	80	2	NP	L <sub>1</sub>	Grup III,IV,V Non T-ALL
14	H.P	6	E	29	8.0	100.0	20	6	7	L <sub>1</sub>	Grup III,IV,V Non T-ALL
15	M.G	5.5	K	12	296.8	30.0	96	3	5	L <sub>1</sub>	Grup III,IV,V Non T-ALL
16	İ.K	11	E	20	16.0	150.0	23	NP	NP	L <sub>1</sub>	Grup III,IV,V Non T-ALL
17	M.K	4	E	15	37.2	45.0	75	9	6	L <sub>1</sub>	Grup III,IV,V Non T-ALL
18	H.Ü	7	K	19	16.4	40.0	80	4	3	L <sub>2</sub>	Grup III,IV,V Non T-ALL
19	D.K	5	K	23	20.6	70.0	94	NP	NP	L <sub>2</sub>	Grup VI Non T-ALL
20	O.A	8	E	27	5.4	90.0	60	4	NP	L <sub>3</sub>	Grup VI Non T-ALL

B.K : Beyaz Küre  
P.Y : Periferik Yayma

**TABLO XII : AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ GRUBUNDAKİ OLGULARIN HÜCRE YÜZEY MARKIRLARI SONUÇLARI**

Sıra No	İsim	E rozet (%)	Smlg (%)	Pan-T3 (CD3) (%)	T4 (CD4) (%)	T8 (CD8) (%)	B4 (CD19) (%)	CALLA (CD10) (%)	HLA-DR (Ia) (%)	İmmünofenotip
1	G.S	21	0	32	17	14	0	0	2	T-ALL
2	H.D	23	0	24	12	11	0	6	8	T-ALL
3	Y.A	9	0	27	14	12	0	0	10	T-ALL
4	C.A	18	0	24	13	10	0	2	2	T-ALL
5	H.H	45	4	38	22	18	0	7	5	T-ALL
6	H.K	32	2	26	16	14	0	0	4	T-ALL
7	E.D	3	3	8	2	3	2	0	46	Grup I Non T-ALL
8	M.Z	4	0	3	2	1	17	3	15	Grup II Non T-ALL
9	M.A	5	1	6	2	4	23	0	18	Grup II Non T-ALL
10	M.B	0	6	0	0	0	18	6	12	Grup II Non T-ALL
11	A.Y	5	2	2	3	2	19	40	70	Grup III,IV,V Non T-ALL
12	M.T	6	0	8	3	1	32	58	83	Grup III,IV,V Non T-ALL
13	M.Ç	2	4	4	2	1	16	45	56	Grup III,IV,V Non T-ALL
14	H.P	3	7	0	0	1	25	26	33	Grup III,IV,V Non T-ALL
15	M.G	4	2	9	7	5	16	16	29	Grup III,IV,V Non T-ALL
16	İ.K	8	3	7	3	3	14	46	50	Grup III,IV,V Non T-ALL
17	M.K	6	2	5	1	2	22	38	49	Grup III,IV,V Non T-ALL
18	H.Ü	8	8	7	4	2	29	55	65	Grup III,IV,V Non T-ALL
19	D.K	3	16	2	1	2	18	0	15	Grup VI Non T-ALL
20	O.A	7	21	6	3	0	19	1	22	Grup VI Non T-ALL

11-18. olgularda Ia ve B4'e ilaveten CALLA antijeni de pozitif olarak bulundu. Bu olgulardaki lenfoblastların pre-B kökenli olduğu ve henüz SmIg'nin belirmediği farklılaşma safhasında oldukları düşünüldü. Cİg ve B1(CD20) çalışmadığımız bu olguları kendi aralarında tekrar sınıflandırmak mümkün olmamış, hepsi birlikte grup III,IV,V non T-ALL (erken pre-B ALL, pre B ALL olarak sınıflandırılmışlardır.

19. ve 20. olgularda Ia ve B4'ün yanısıra SmIg'de pozitif bulundu. Bu olguların lenfoblastlarının B-hücre kökenli olduğu tesbit edildi ve grup VI non T-ALL (B-ALL) olarak sınıflandırıldı.

Böylece tüm ALL'li olguların immünolojik tiplendirilmesi yapıldıktan sonra T-ALL ve non T-ALL olmak üzere iki ana gruba ayırdığımızda; tüm olguların % 30'unun (6 olgu) T-ALL, % 70'inin de (14 olgu) non T-ALL olduğu bulundu. Ayrıca tüm olguların % 5'inin grup I, % 15'inin grup II, % 40'ının grup III,IV,V ve % 10'unun da grup VI non T-ALL olduğu saptandı.

T-ALL grubundaki 3'ü erkek 6 hastanın en küçüğü 6.5 en büyüğü ise 14 yaşında idi. (ort yaş :  $11.7 \pm 3.02$  yıl) ( $\pm 2$  SD) idi. 6 hastanın 5'inde belirgin hepatosplenomegali ( $\geq 5$ cm), ikisinde de mediastinal kitle saptandı. FAB sınıflandırmasına göre altı hastanın dördünde L<sub>1</sub>, ikisinde de L<sub>2</sub> morfolojik özellikleri saptandı. T-ALL grubundaki hastaların ortalama Hct, Bk ve trombosit sayımları tablo XIII'de verilmiştir.

Non T-ALL grubundaki 8'i erkek 6'sı kız 14 hastanın en küçüğü 10 aylık, en büyüğü ise 13 yaşında (ort yaş :  $6.4 \pm 3.6$ ) ( $\pm 2$  SD) idi. 14 hastanın 3'ünde hepatomegali saptanmazken 6'sında orta derecede ( $< 5$  cm), 5'inde de belirgin derecede ( $\geq 5$  cm) hepatomegali saptandı. Bu gruptaki hastaların hiç birinde mediastinal kitleye rastlanmadı, 6'sında da dalak palpe edilmedi. 5 hastada orta derecede ( $< 5$  cm) 3 hastada ise belirgin ( $\geq 5$  cm) splenomegali saptandı. Non T-ALL grubundaki hastaların ortalama Hct, Bk, trombosit sayımları tablo XIII'de verilmiştir.

T-ALL grubundaki hasta sayısı az olmasına rağmen her iki gruptaki olguların başlangıç bulguları karşılaştırıldı. Gruplar arasında, cinsiyet ( $p>0.5$ ), hepatomegali ( $p>0.1$ ), Hct ( $p>0.5$ ) ve trombosit sayımları ( $p>0.1$ ) ve FAB sınıflandırması ( $p>0.5$ ) açısından belirgin istatistiksel fark bulunmadı.

**TABLO XIII : KLİNİK ÖZELLİKLERİ YÖNÜNDE T-ALL ve NON T-ALL GRUPLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

Klinik Öz. Gruplar	Yaş (yıl)	Cinsiyet (Erkek %)	Hct %	BK ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Trombosit ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Organomegali	
						Karaciğer (cm)	Dalak (cm)
<b>T-ALL</b>	11,75±3.02 (6.5-14)	50.00	23.7±5.1 (17-28)	449±420 (72.6-1016)	45±29 (10-90)	5.5±2.1 (2-8)	7.3±3.8 (0.10)
<b>Non T-ALL</b>	6.4±3.6 (10 ay-13)	57.14	23.6±6.4 (15-35)	47±88 (5.4±296.8)	61±42 (10-150)	3.7±2.8 (0-9)	2.9±2.8 (10-7)
<b>p değerleri</b>	<0.005	> 0.5	> 0.5	< 0.005	> 0.1	> 0.1	< 0.01

Parantez içindeki rakamlar en küçük ve en büyük değerleri göstermektedir.  
± 2SD

Yaş, Bk değerleri ve dalak büyüklükleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu. Buna göre T-ALL grubundaki olguların non T-ALL grubundaki olgulara göre genellikle daha büyük yaşlara sahip çocuklardan oluştuğu ( $p<0.005$ ) ve bu olguların splenomegalilerininin daha büyük olduğu ( $p<0.01$ ) ve Bk değerlerininin daha yüksek seyrettiği ( $p<0.005$ ) bulundu.

## II) NORMAL DEĞERLER

Yapılan deneylerin sağlıklı olup olmadığını teyid etmek için, kontrol grubu olarak yaşları 4 ila 13 yaş arasında değişen (ort:8.3±2.8 yaş) 10'u erkek 20 sağlıklı çocuk seçildi. Tablo XIV'de hücre yüzey markırları kullanılarak, kontrol grubunu oluşturan olgulardan elde edilen ortalama değerler verilmiştir. Ayrıca tablo XV'de kontrol grubuna ait değerler toplu olarak gösterilmiştir.

**TABLO XIV : Kontrol grubunun hücre yüzey markırları ortalama değerleri**

E- Rozet	: % 60.10 ±5.63
SmIg	: % 25.35 ±3.80
HLA-DR (Ia)	: % 20.95±3.34
T3 (CD3)	: % 49.70±5.59
T4 (CD4)	: % 32.00±4.91
T8 (CD8)	: % 22.54±4.28

(± 2 SD)

**TABLO XV : KONTROL GRUBUNDAKİ OLGULARIN HÜCRE YÜZEY MARKIRLARI SONUÇLARI**

Sıra No	İsm	Yaş (yıl)	Cinsiyet	Smİg %	E-Rozet %	T3 %	T4 %	T8 %	Ia %
1	D.A	10	E	28	54	41	22	18	28
2	M.B	8	E	26	57	50	30	24	22
3	A.B	7	E	25	58	49	31	20	21
4	A.A	7	E	29	59	52	33	20	18
5	A.Y	8	K	27	55	51	32	23	23
6	D.A	9	K	21	49	39	30	17	24
7	H.Ç	6	E	20	54	42	29	18	16
8	T.K	10	K	22	58	46	23	22	17
9	Z.G	5	K	23	65	44	35	16	18
10	Ö.Y	5.5	K	22	64	51	31	22	19
11	Ş.A	13	E	23	67	56	36	32	20
12	Y.Ü	12.5	E	30	57	53	31	21	16
13	R.İ	11.5	K	24	63	52	33	28	20
14	F.Ö	4	K	28	62	59	36	30	24
15	H.C	6.5	E	31	61	57	35	27	22
16	S.P	10.5	E	24	65	48	36	21	21
17	M.K	4	E	22	69	58	35	26	23
18	A.Ş	13	K	32	55	46	32	22	18
19	Ö.S	8.5	K	20	71	52	44	20	27
20	Z.F	7	K	30	59	48	26	24	22



## T A R T I Ş M A

Son onbeş yılda, hibridoma teknolojisinin bulunması ve moleküler biyolojideki hızlı gelişmeler sayesinde lösemnin hücresele orijini hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Böylece, hastalığın etyolojisinin daha iyi anlaşılması için önemli adımlar atılmıştır.

Lösemilerin sadece hücresele morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılması, lenfoblastların orijinini aldığı hücre tipinin belirlenmesinde yeterli olmamaktadır. Akut lenfoblastik lösemi gerek klinik özellikleri gerek prognozu yönünden heterojen bir hastalıktır. Bu heterojenlik lösemik transformasyonun kaynaklandığı hücre tipi ile ilişkilidir. Lösemilerin oluşması hakkında günümüzde benimsenen görüş, hücrelerin matürasyonunun farklılaşma süreçlerinin herhangi bir evresinde duraksaması ve lenfoblastların o evreye ait hücre klonlarını oluşturacak şekilde proliferen olmasıdır.<sup>(1)</sup>

ALL, lenfosit yüzey antijenlerinin çeşitli markırlarla belirlenmesiyle farklı alt gruplara ayrılmıştır. Başlangıçta T-ALL; B-ALL; non B,non T-ALL ve sınıflandırılmayan-ALL şeklinde yapılan sınıflandırma daha sonraları Cig'nin test edilmesi; CALLA, Ia B<sub>1</sub> ve B<sub>4</sub> antijenlerini belirleyen markırların geliştirilmesiyle yeniden değişikliğe uğramıştır.<sup>(21,23,40)</sup> Son zamanlarda özellikle immunglobulinlerin gen yapılarına ve B hücre antijenlerine özgül monoklonal antikorlarla yapılan çalışmalar, non B, non T-ALL olgularındaki lenfoblastların B-hücre kökenli olduklarını kanıtlamıştır.<sup>(31,32,40,41)</sup>

Günümüzde lenfoblastların orijinini aldıkları hücre tipine göre T-ALL- B-ALL, erken pre B-ALL ve pre B-ALL olarak da sınıflandırılabilen ALL<sup>(8)</sup>; en son T-ALL ve non T-ALL olarak iki ana gruba sınıflandırılmakta ayrıca T-ALL üç, non T-ALL altı alt gruba ayrılmaktadır.<sup>(23)</sup> Araştırmamızda bu son sınıflandırma kullanılarak olgularımız değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Bu çalışmada ALL tanısı almış 20 olgunun periferik kan lenfoid hücreleri klasik metodlarla (E-rozet ve Smİg immünfloresan testi) ve monoklonal antikor tekniği kullanılarak hücre yüzey antijenleri incelenmiştir. Buna göre incelenen 20 olgunun altısı'nın (%30) T-ALL, 14'ünün de (%70) non T-ALL immunofenotipinde olduğu anlaşılmıştır. Monoklonal antikorlar kullanılarak non T-ALL grubu kendi arasında da sınıflandırılmış, böylelikle tüm olguların %15'inin grup I, %15'inin grup II, %40'ının grup III,IV,V, %10'unun da grup VI non T-ALL özelliklerine sahip oldukları bulunmuştur. Sitoplazmik immunglobulin (Cİg) ve B<sub>1</sub> (CD20) çalışılmadığından III, IV, ve V alt grupların sınıflandırılması daha ileriye götürülemedi, bu gruplardaki olgular bir arada değerlendirilmiştir. Literatürde sıklığı genellikle %15-25 olarak bildirilen<sup>(5,18,45,46,57)</sup> T-ALL'ye grubumuzda biraz daha sık olmak üzere %30 oranında rastlanmıştır. Hasta grupları bizimki gibi küçük olan araştırmacıların<sup>(7,8,10,13,55)</sup> raporlarında da T-ALL insidansı %30 olarak belirlenmiştir. Yine sıklığı %5 olarak bildirilen B-ALL'de (grup VI, non T-ALL) grubumuzda %10 olmak üzere fazla bulunmuştur. Bu fark bölgesel nedenlerden olabileceği gibi, çalışmaya dahil edilen olgu sayısının az olması ile de ilişkili olabileceği kanısındayız.

T-ALL'yi sınıflandırmada tek başına E-Rozet testinin yetersiz olduğu, nitekim E-Rozet testi negatif olan bazı olgularda anti-T hetero antiserumlarının ve monoklonal antikorlarının pozitif bulunduğu rapor edilmiştir. <sup>(4,43,52)</sup> Bu çalışmada da T-ALL'li iki olguda E-Rozet testi negatif bulunurken lenfoblastların T hücresine özgül monoklonal antikorlarla reaksiyona girdiği gözlenmiştir.

T-ALL'ye daha çok erkeklerde olmak üzere genellikle daha büyük yaşlardaki çocuklarda (>10 yaş) rastlanır ve bunlarda hepatosplenomegali ve mediastinel kitleler daha sıktır.<sup>(17,23,45,57)</sup>

Esas amacı ALL olgularının immunofenotiplerinin belirlenmesi olan bu çalışmada özellikle T-ALL grubundaki olgu sayısı sınırlı olmasına rağmen hastalığın başlangıcındaki klinik ve laboratuvar bulgular gözden geçirildiğinde; T-ALL ve non T-ALL grupları arasında cinsiyet, karaciğer büyüklüğü, trombosit ve Hct değerleri bakımından istatistiksel bir fark bulunmazken, yaş, beyaz küre ve dalak büyüklüğü açısından istatistiksel farklar elde edilmiştir.

Buna göre T-ALL grubundaki olguların, non T-ALL grubundaki olgulara göre genellikle daha büyük yaşlara sahip çocuklardan oluştuğu (ort: 11,7 ± 3,2 yaş; p < 0,005), beyaz küre değerlerinin daha yüksek seyrettiği (ort: 449±420 x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>; P<0,005) ve bunların daha belirgin splenomegalilerinin mevcut olduğu (ort: 7,3±3,8 cm; p<0,01) bulunmuştur.

Buradaki T-ALL olgularında literatürün tersine erkek/kız oranı eşit bulunmuştur; buna grubun çok küçük olması neden olarak gösterilebilir. Yine literatürle uyumsuz olarak karaciğer büyüklüğü bakımından gruplar arasından önemli istatistiksel fark elde edilmemiştir. Ancak araştırmacılar çalışmalarında karaciğerin büyüklüğünden çok, belirgin olarak büyümesini (≥ 5cm) kriter olarak almışlardır.<sup>(45,57)</sup> Bu çalışmada da dikkat edilirse altı T-ALL olgusunun dördünde karaciğerin belirgin olarak ( ≥ 5cm ) büyüdüğü görülmektedir, oysa non T-ALL grubundaki 14 hastanın sadece üçünün hepatomegalileri 5 cm. den büyük bulunmuştur. Buna göre olgularımızdaki hepatomegalinin derecesi arasındaki fark istatistik anlam taşımamakla birlikte T-ALL grubundaki daha büyük hepatomegaliye meyil olduğu izlenimi elde edilmektedir.

Mediastinal kitleye T-ALL olgularının ikisinde (%33,3 ) rastlanırken non T-ALL olgularının hiç birinde rastlanmamıştır. Olgu sayısı az olmakla beraber bu sonuç literatürle uyumlu bulunmuştur.<sup>(25,52)</sup> FAB sınıflandırılmasına göre ALL olgularının %63-74'ünün L<sub>1</sub> morfolojisi gösterdiği bilinmektedir.<sup>(38,59)</sup> Bundan evvel yapılan çalışmalarda da hücre membran markerları ile FAB morfolojik kriterleri arasında, L<sub>3</sub> morfolojisi ile B- hücreli lösemi/lenfoma hariç bir korelasyon bulunamamıştır. Bu çalışmada T-ALL grubundaki altı hastanın dördü (%66,6); non T-ALL grubunda ise 14 hastanın 9'u (%64,2) L<sub>1</sub> morfolojik özellikleri göstermiştir. FAB kriterleri bakımından gruplar arasında istatistiksel bir fark gözlenmezken bu sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur. Ayrıca grup VI non T-ALL'deki (B-ALL) hastalardan birinin kemik iliği aspirasyonunda L<sub>3</sub> morfolojik özellikleri saptanmıştır.

Kontrol grubu olarak incelenen 20 sağlıklı olgunun hücre yüzey markırları sonuçları literatürle uyumlu bulunmuş olup bu da çalışmamızdaki metodların güvenilirliğine işaret etmektedir.<sup>(67)</sup>

Çalışmamız, hastahanemizde görülen akut lenfoblastik lösemi olgularının, son yıllarda gelişen hücre immunofenotipi belirleme yöntemleri ile hastalığın kaynaklandığı hücreler hakkında daha detaylı bilgi edinebileceğimizi vurgulamaktadır.

Monoklonal antikörlerin uygulama alanına girmesi ile birlikte immunoloji, hematoloji, onkoloji, mikrobiyoloji ve genetik alanlarında büyük başarılar elde edildi. Özellikle lösemi'de lenfoblastların immunofenotipinin belirlenmesi olguların prognozunu tayin etmede ve tedavi seçiminde faydalı olmaktadır.

Sonuç olarak ; Akut lenfoblastik lösemi'de lenfoblastların monoklonal antikör tekniğinin kullanılmasıyla immünofenotiplerinin tayini pahalı bir yöntem olmakla birlikte, kemoterapi protokollerinin seçimi sırasında yüksek risk gruplarının tayini ve monoklonal antikörlerle kemoterapi ile ilgili çalışmaların hızlanması, lenfoblastların immünofenotipinin tayini ile ilgili çalışmaların önemini arttırmaktadır. Bu nedenle monoklonal antikör çalışmalarının yaygınlaştırılmasının yararlı olacağı kanısındayız.

## Ö Z E T

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji-Onkoloji Kliniğine Nisan 1989-Nisan 1990 tarihleri arasında müracaat ederek akut lenfoblastik lösemi tanısı alan 20 olgunun ve aynı yaş grubundaki 20 sağlıklı kontrolün klasik metodlar ve monoklonal antikor tekniği kullanılarak lenfosit tiplendirmesi yapıldı. Akut lenfoblastik lösemnin immünolojik sınıflandırması Foon ve arkadaşlarının 1986'da yayınladıkları yeni tasnife göre yapılarak karşılaştırıldı.

Elde edilen sonuçlar şöyle sıralanabilir :

1) Çalışmaya alınan 20 ALL olgusunun hücre yüzey antijenlerine göre % 30'unun T-ALL; % 15'inin grup I, % 5'inin grup II, % 40'ının grup III, IV,V ve % 10'unun da grup VI olmak üzere % 70'inin non T-ALL olduğu belirlendi.

Bir başka deyişle, lenfoblastların altı olguda T-lenfositlerden, iki olguda B-lenfositlerden 12 olguda da B-lenfosit öncülerinden (erken pre-B ve pre-B) köken aldığı bulundu. Sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında grubumuzda B-ALL (grup VI non T-ALL) olgularına biraz daha fazla rastlandı.

2) Özellikle T-ALL grubundaki olgu sayısının az olmasına rağmen lenfoblastların immünofenotipi ile klinik özellikler arasındaki ilişki olup olmadığını araştırmak için T-ALL grubu ile non T-ALL grubundaki olgular klinik bulgular bakımından birbirleriyle karşılaştırıldı. Buna göre;

- a) T-ALL grubundaki olguların non T-ALL grubundaki olgulara nazaran daha büyük yaşlardaki çocuklardan oluştuğu ( $p<0.005$ ) ve bu farkın literatürle uyumlu olduğu bulundu.
- b) Literatürde T-ALL'ye erkeklerde daha sık rastlandığı bildirilmesine rağmen,

olgularımızda her iki grup arasında cinsiyet bakımından istatistiksel bir fark bulunmadı ( $p > 0.5$ ).

c) Hct değerleri bakımından literatürle uyumlu olmak üzere her iki grup arasında bir fark görülmedi. ( $p > 0.5$ ).

d) T-ALL grubundaki olguların literatürle benzer şekilde beyaz küre sayımlarının daha yüksek seyrettiği bulundu ( $p < 0.005$ )

e) Literatürle uyumlu olarak iki grup arasında trombosit sayımları bakımından bir fark bulunmadı ( $p > 0.1$ )

g) Hepatomegali büyüklüğü bakımından iki grup arasında istatistiksel bir fark bulunmazken ( $p > 0.1$ ); T-ALL grubunda daha büyük ( $> 5$  cm) hepatomegaliye meyil olduğu izlenimi elde edildi; literatürle uyumlu bulundu.

h) Yine literatürle uyumlu olmak üzere mediastinel kitleye T-ALL grubunda daha sık (%33.3) rastlanırken, non T-ALL grubunda mediastinel kitleye rastlanmadı.

ı) T-ALL grubundaki hastaların % 66.6'sı Non-T-ALL grubunda ise % 64.2'si  $L_1$  morfolojik özellikleri gösterirken FAB kriterleri bakımından gruplar arasında istatistiksel bir fark gözlenmedi ( $p > 0.5$ ). Bu sonuçlar literatürle uyumlu bulundu.

3) Sağlıklı olgularda elde edilen periferik kan lenfosit ve lenfosit alt gruplarının oranları literatürle uyumlu bulunmuştur.

Klasik yöntemlerle ve monoklonal antikorlarla yapılan hücre immünofenotipini belirleme çalışmaları ileride incelenen olgu sayılarının arttırılması ve vakaların takibi ile prognozun belirlenmesi ve tedaviye cevap yönünden de önemli sonuçlar sağlayacaktır.

## K A Y N A K L A R

- 1) Barrett JJ: Textbook of Immunology. The C.V. Mosby Company,1989.
- 2) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) Co-operative group. Br.J.Haematol. 33:451-458, 1976.
- 3) Bloomfield CD and Gajl-Peczalska KJ: The clinical relevance of lymphocyte surface markers in leukemia and lymphoma. Curr. Top. Haematol 3:175,1980.
- 4) Borella L, Sen L: T cell surface markers on lymphoblasts from acute lymphocytic leukemia. J. Immunol 11:1257-1260,1973.
- 5) Borowitz MJ, Dowell BL, Boyett JM,et al: Monoclonal antibody definition of T-cell acute leukemia: A Pediatric Oncology Group Study. Blood 65:785-788,1985.
- 6) Böyum A: Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand J.Clin. Lab. Invest.21 (Suppl,97):51-76,1968.
- 7) Brouet JC, Valensi F, Daniel MT, et al: Immunological classification of acute lymphoblastic leukemias. Evaluation of its clinical significance in a hundred patients. Br.J. Haematol 33: 319 - 328,1976.
- 8) Brown G, Greaves J, Okos A, et al: The expression of human T and B lymphocyte cell surface markers on leukemic cells. Lancet 2:753,1974.
- 9) Brown G, Ling RN: Antibodies a practical approach Vol I (edited by Catty D) : Murine monoclonal antibodies. IRL Press Oxford, Washington DC 1989.
- 10) Catovsky D, Galetto J, Okos A, et al: Cytochemical profile of B and T leukemic lymphocytes with special reference to acute lymphoblastic leukemia. J.Clin. Pathol 27:767,1974.
- 11) Catovsky D, Greaves MF, Pain C, et al: Acid Phosphatas reaction in acute lymphoblastic

- leukemia. *Lancet* 1,749,1978.
- 12) Chessels JM, Hardisty RM, Rapson NT, et al: Acute lymphoblastic leukemia in children: Classification and Prognosis. *Lancet* 2: 1307-1309,1977.
  - 13) Chin AH, Saiki JH, Trujilla JM, et al: Peripheral blood T and B lymphocytes in patients with lymphoma and acute leukemia. *Clin Immunol Immunopathol* I: 499,1974.
  - 14) Coccia P, Miler DR, Kersey JH, et al: Relationship of blast cell surface markers and morphology (FAB classification) in childhood acute lymphocytic leukemia. *Blood* 54: (Suppl, 1) 182,1979.
  - 15) Cooper MD, Lawton AR, Bockman DE: Agammaglobulinemia with B lymphocytes. *Lancet* 2: 791-794,1971.
  - 16) Crist WM, Boyett J, Roper M, et al: Pre-B leukemia respond poorly to treatment. A Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 63: 407-414,1984.
  - 17) Crist WM, Grossi CE, Pullen DJ, et al: Immunologic markers in childhood acute lymphocytic leukemia. *Seminars in Oncology* 12 (2) : 105-121,1985.
  - 18) Dowell BL, Borowitz MJ, Boyett JM, et al: Immunological and clinicopathologic features of common acute lymphoblastic leukemia antigen-positive childhood T-cell leukemia. A Pediatric Oncology Group Study. *Cancer* 59:2020-2026,1987.
  - 19) Ferrarini M, Grossi CE: Definition of the cell types within so called "null lymphocytes" population of human peripheral blood: An analysis of phenotypes and functions. *Semin. Hematol* 21:270-286,1984.
  - 20) Fledges AJ, Aur RJA, Verzosa MS, et al: Periodic acid-Schiff reaction, a useful index of duration of complete remission in ALL. *Acta Haematol* 52: 8,1974.
  - 21) Foon KA, Gale RP, Todd RF III: Recent advances in the immunologic classification of leukemia. *Semin Hematol* 23:257-283,1986.
  - 22) Foon KA, Schroff RW, Gale RP: Surface markers on leukemia and lymphoma cells : Recent advances. *Blood* 60:1-19,1982.
  - 23) Foon KA, Todd RF III: Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 68 : 1 - 31, 1986.



- 24) Greaves MF, Brown G, Rapson NT, et al: Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells.  
Clin Immunol Immunopathol 4 : 67, 1975.
- 25) Greaves MF, Janossy G, Peto G, et al: Immunologically defined subclasses of acute lymphoblastic leukemia in children: their relationship to presentation features and prognosis. Br. J. Haematol 48: 179-197, 1981.
- 26) Gordon J: Antibodies a practical approach Vol I (edited by Catty D): Human monoclonal antibodies. IRL Press Oxford, Washington DC, 1989.
- 27) Hansel TT: Leucocyte Typing - OKCD ? Lancet 8572:1382-83, 1987.
- 28) Janossy G: Bone marrow purging. Immunol Today. 8:253-55, 1987.
- 29) Jondal M, Holm G and Wigzell H: Surface markers on human T and B lymphocytes. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. J. Exp. Med 136:207, 1982.
- 30) Komado V, Azuma E, Tanaka S, et al: Immunological subclassification of non T, non-B acute lymphoblastic leukemia in childhood. Scand. J. Haematol 36:85-91, 1986.
- 31) Korsmeyer SJ, Arnold A, Bakhshi A, et al: Immunoglobulin gene rearrangement and cell surface antigen expression in acute lymphocytic leukemias of T cell and B cell precursor origins. J. Clin. Invest 71: 301-313, 1983.
- 32) Korsmeyer SJ, Hieter PA, Ravetch JV, et al: Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemia pre-B cells. Proc, Natl Acad Sci. (USA) 78: 7096, 1981.
- 33) Köhler G, Milstein C: Continuous cultured of fused cells secreting of predefined specificity. Nature 256:495-497, 1975.
- 34) Kung PC, Goldstein G, Reinherz EC, et al: Monoclonal antibodies defining constitutive human T cell surface antigens. Science 206: 347-349, 1979.
- 35) Laurence J. Lymphocyte markers in healthy and disease. Disease a month. 30:4, 1984.
- 36) Le Bien TW, Boue DR, Bradley G, et al: Antibody affinity may influence antigenic modulation of the common acute lymphoblastic leukemia antigen in vitro.

- J. Immunol 129 : 2287,1982.
- 37) Linc M, Warnke R, Finloy J, et al: A single monoclonal antibody identifies T-cell lineage of childhood lymphoid malignancies. Blood 62: 722-728, 1983.
  - 38) Miller DR, Beahner RL (editors) Blood Diseases of Infancy and Childhood. 5th edition. The C.V. Mosby Company, 1984.
  - 39) Nadler LM, Anderson KC, Mart G, et al: B4 a human B lymphocyte associated antigen expressed on normal mitogen activated, and malignant B lymphocytes. J. Immunol 131:244-250,1983.
  - 40) Nadler LM, Korsmeyer SJ, Anderson KC, et al: B cell origin of non T cell acute lymphoblastic leukemia. A model for discrete stages of neoplastic and normal pre-B cell differentiation. J.Clin.Invest 74:332-340,1984.
  - 41) Nadler LM, Ritz J, Bates M, et al: Induction of human B-cell antigens in non-T cell acute leukemia. J.Clin. Invest.70:433-442,1982.
  - 42) Pierce MI, Borges WH, Heyn R, et al : Epidemiological factors and survival experience in 1770 children with acute leukemia. Cancer 23:1296,1969.
  - 43) Pincus JK, Falletta FM, Petzgar R, et al : The accuracy of identifying T cell leukemia using E-rosetting of bone marrow lymphoblasts. Pediatr. Res 15:4,602,1981.
  - 44) Preud'homme JL, Seligman M: Surface bound immunoglobulin as a cell marker in human lymphoproliferative diseases. Blood 40:777-794,1972.
  - 45) Pui CH, Behm FG, Singh B, et al: Heterogeneity of presenting features and their relation to treatment outcome in 120 children with T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 75 : 174 - 179,1990.
  - 46) Pullen DJ, Boyett JM, Crist WM, et al: Pediatric Oncology Group utilization of immunologic markers in the designation of acute lymphocytic leukemia. Ann NY Acad Sci 482:262,1984.
  - 47) Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, et al: Discrete stages of human intratymic differentiation : Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-

- cell lineage. Proc Natl Acad Sci (USA) 77:1588-1592,1980.
- 48) Ritz J, Nadler LM, Bhan AK, et al: Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen(CALLA) by lymphomas of B-cell and T-cell lineage. Blood 58:648,1981.
  - 49) Ritz J, Pesando JM, Notis-Mc Conarty. et al: A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukemia antigen. Nature 283:583,1980.
  - 50) Rogers GT, Rawlings GA, Bagshawe KD: Somatic-cell hybrids producing antibodies against CEA. Br.J. Cancer 43:1,1981.
  - 51) Roitt I: Essential Immunology sixth edition. Blackwell scientific publications. Oxford, 1989.
  - 52) Roper M, Crist WM, Metzgar R, et al: Monoclonal antibodies characterization of surface antigens in childhood T-cell lymphoid malignancies. Blood 61:830-837,1983.
  - 53) Sallan SE, Ritz J, Pesando J, et al: Cell surface antigens: prognostic implications in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 55:395-402,1980.
  - 54) Schroff RW, Foon KA, Billing RJ, et al: Immunologic classification of lymphoid leukemias based on monoclonal antibody defined cell surface antigens. Blood 59 : 207 - 215, 1982.
  - 55) Sen L, Borella L: Clinical importance of lymphoblasts with T markers in childhood acute leukemia. N. Eng.J.Med. 292: 828,1975.
  - 56) Shaw MT, Humprey BG, Lawrence R, et al: Lack of prognostic value of periodic acid-Schiff reaction and blast cell size in childhood ALL, Am.J.Haematol 2: 237,1977.
  - 57) Shuester JJ, Falletta JM, Pullen J, et al: Prognostic factors in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: A Pediatric Oncology Group Study. Blood 75 : 166 - 173,1990.
  - 58) Smithson WA, Li CY, Pierre RV, et al: ALL in children: Immunologic, cytochemical morphologic and cytogenetic studies in relation to pretreatment risk factors. Med. Pediatr. Oncol. 7:83,1979.
  - 59) Sutow WW, Clinical Pediatric Oncology. third edition. The C.V. Mosby Company. Toronto,1984.

- 60) Sümbülođlu. K, Sümbülođlu V: Biyoistatistik. Çağ Matbaası, Ankara,1987.
- 61) Tsukimoto I, Wong KY, Lampkin BC: Surface markers as prognostic factors in childhood acute leukemia. N.Eng.J. Med. 294: 245,1976.
- 62) Tsung YK, Milunsky A, Albert E: Secretion by a hybridoma of antibodies against human alfa fetu protein. N.Eng.J.Med. 302: 180,1980.
- 63) Williams ME, Innes DJ, Borowitz MJ, et al: Immunoglobulin and T cell reseptor gene arrangements in human lymphoma and leukemia. Blood 69: 79-86,1986.
- 64) Wintrobe MD: Clinical Hematology : 8 th ed. Philadelphia, Lea and Febiger, 1981
- 65) Vodinelich L, Tax W, Bai Y, et al: A monoclonal antibody (WT1) for detecting leukemias of T-cell prekursors (T-ALL/ Blood 62: 1108-1113,1983.
- 66) Vogler LB, Crist WM, Bockman DE, et al: Pre-B cell leukemia. A new phenotype of childhood lymphoblastic leukemia. N.Eng.J.Med. 298: 872-878,1978.
- 67) Yoshuo Y, Toshuo T, Okumora K: Lymphocyte antibodies in healty children. Ped. Res. 20 : 1147-1151,1986.