

13590

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

T. G.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

HODGKIN-DIŞI LENFOMALARIN
İMMÜNOFENOTİPLENDİRİLMESİ

TEZYÖNETİCİSİ

Doç.Dr.Turhan Okten

13590

Dr. Olgun KONTAŞ

UZMANLIK TEZİ

KAYSERİ-1991

İÇİNDEKİLER

Giriş ve amaç	5
Genel bilgiler	
Lenfositin embriyolojik gelişimi	7
Lenfosit transformasyonu	11
Lenfoma sınıflamaları	16
İmmünohistokimyasal yöntemler	20
Materyal ve metod	27
Bulgular	30
Tartışma	36
Sonuç	50
Özet	52
Summary	53
Kaynaklar	54

TABLO, ŐEKIL VE RESİMLER

A. Tablolar

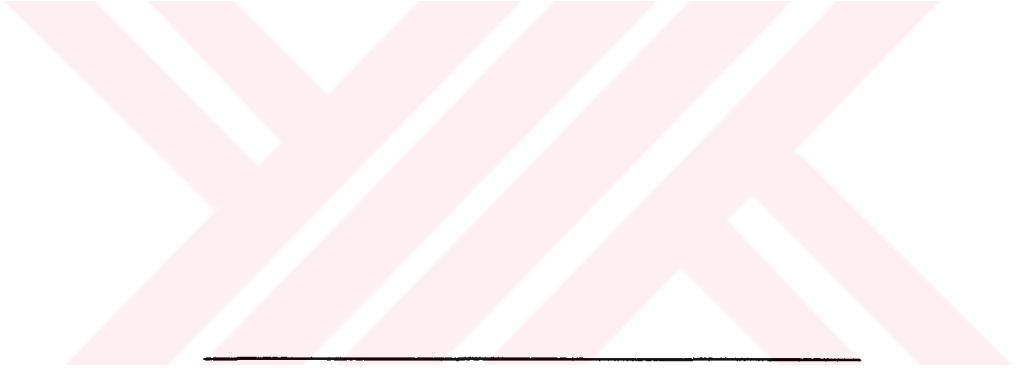
Tablo I. Hodgkin-dışı lenfomalar için Working Formulation'a esas olan sınıflamaların sinonimleri	21
Tablo II. Vak'aların skorlanması	29
Tablo III. IWF'a göre tanuların dağılımı	30
Tablo IV. Toplu sonuçlar	31
Tablo V. B ve T lenfomaların oranları	32
Tablo VI. Histopatolojik tanılara göre B ve T lenfomaların dağılımı	33
Tablo VII. Hodgkin-dışı B lenfomaların malign immünofenotipik zellikleri	46
Tablo VIII. Hodgkin-dışı T lenfomaların malign immünofenotipik zellikleri	48

B. Şekiller

Şekil 1. Immün sistem hücrelerinin gelişimi	10
Şekil 2. Lenf bezinin şematik gösterimi	11
Şekil 3. Follikül merkez hücresi görüşünün şematik gösterimi	12
Şekil 4. B lenfositin hücre siklusu sırasındaki çeşitli morfolojik formlar ve bunlardan kaynaklanan neoplazmlar	15
Şekil 5. Değişik B ve T lenfomaların "camera lucida" çizimleri	17
Şekil 6. Lenf bezinin değişik bölgelerinden kaynaklanan neoplazmlar	18
Şekil 7. Immünoperoksidaz metodlar	23
Şekil 8. Avidin-biotin peroksidaz teknikleri	24
Şekil 9. İnsan T hücre reseptörünün şematik yapısı	48

C. Resimler

Resim 1. Vak'aların skorlanması	29
Resim 2. B hücre serisine ait bir Hodgkin-dışı lenfoma vak'ası	33
Resim 3. T hücre serisine ait bir Hodgkin-dışı lenfoma vak'ası	34
Resim 4. B ve T hücre serisine ait olduğu ayırdedilemeyen bir Hodgkin dışı lenfoma vak'ası	35
Resim 5. Lenf bezi metastazı yapmış bir küçük hücreli akciğer karsinomu vak'asında lenfositlerle karsinom hücrelerinin LCA ile ayırdedilmesi	39



Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu

bu çalışmayı

90-011/ 013 numaralı araştırma projesi olarak

desteklemiştir

GİRİŞ VE AMAÇ

Lenfomalar immün sistem hücrelerinin neoplazmlarıdır^{24,32,33}. Klasik olarak malign lenfoma tanısı klinisyence alınan doku biyopsisinin histopatolojik olarak incelenmesi sanatına dayanır ^{16,42}. Tanı kriterleri de uzun yıllar boyunca biriken tecrübeler ve klinikopatolojik değerlendirmeleri temel almaktadır ⁴². Ancak bazan kısmen neoplastik hücrenin orijinini anlamadaki güçlükler, kısmen de morfolojik özellikleri değerlendirmede kullanılacak pozitif hücre tanımlayıcılarının olmaması sebebiyle Hodgkin-dışı lenfoma tanısı diyagnostik patolojinin en zor konularından biri olabilir ^{33,42}.

Her yıl teşhis edilen malign lenfoma sayısı giderek artarken tedavideki modern ve başarılı uygulamalar sonucunda bu hastalıklara bağlı ölümler ise giderek azalmaktadır ^{16,39}. Başarılı bir tedavinin ilk şartı doğru tanıdır ¹⁶. Farklı tanımlar arasında büyük prognostik ve terapötik değişiklikler olması nedeniyle tanının doğru olarak konması çok önemli olmaktadır. Patologların benign ve malign lenfoproliferasyonları ayırdedebilmelerindeki güçlük sadece vak'aların karmaşık olmasından değil biraz da klinisyenlerin giderek artan oranda daha küçük biyopsi materyali ile tanı konmasını istemelerinden kaynaklanmaktadır ³³. Biyopsilerin çoğunda bir güçlük çıkmasa da önemli sayıda vak'ada malignitenin cinsi konvansiyonel yöntemlerle tam olarak ortaya konamayabilir ¹⁶.

Lenfositlerin B ve T hücre tiplerinin olduğunun anlaşılmasından sonra bunlardan kaynaklanan tümörlerin de B ve T hücre tiplerinin olması gerektiği düşünölmüştür. Genellikle Hodgkin hastalığıyla Hodgkin-dışı lenfomanın ayrımı histolojik olarak mümkündür ancak diffüz lenfomaların B ya da T hücre serisine ait olduklarının söylenebilmesi konvansiyonel histolojik çalışmalarla çok zordur ³⁹. Oysa farklı hücrelerden kaynaklanan tümörlerin tedavi ve prognozları da farklılıklar gösterebilir. Böyle vak'alarda uygun tedavinin planlanması da güç olacaktır ¹⁶. Bu gibi problemlerin büyük çoğunluğu immünohistokimya ile çözüme kavuşturulabilir ^{16,39}.

Bu çalışmada Hodgkin-dışı lenfomaların konvansiyonel yöntemlerle başarılamayan B ve T hücre tiplendirmesinin yapılması, bu tiplendirme ile morfolojik tanılar arasındaki ilişkilerin karşılaştırılması ve bu şekilde tedavideki muhtemel gelişmelere ışık tutulması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Lenfositin embriyolojik gelişimi

Lenfoma hücrelerinin de normal hücre popülasyonlarından geliştikleri ve ana hücrelerin morfoloji ve fonksiyonlarını yansıttıkları kabul edilir . Bu nedenle ana hücrelerin iyi bilinmesi şarttır ³².

Embriyolojik, anatomik ve fonksiyonel olarak immün sistem üç ana gruba ayrılır: T lenfositler, B lenfositler ve makrofajlar. B ve T lenfositlerin kaynaklandığı ana hücreler ilk defa yolk kesesinde kan adacıklarında görülürler ve gebelik süresince karaciğer, dalak ve kemik iliğine göç ederler. Primer lenfoid organlar olan timus ve kuşlardaki bursa fabricius'a (insandaki karşılığı muhtemelen fetal karaciğerdir) göç etmeden önce bu hücrelerin orijinleri ortaktır. T ve B lenfositlerin fonksiyon kazanabilmeleri için pek çok antijenik özelliği "öğrenmeleri" ve diferansiye olmaları gerekir. Bu amaçla primer lenfoid organlar olan timus ve insan fetal karaciğeri, B ve T hücrelerinin diferansiye oldukları, yüzey antijenlerinin değiştiği, subgrupların ortaya çıktığı ve artık bazı spesifik fonksiyonların geliştiği bir ilkokul görevi görürler. Sonuçta "ilkokul"u bitiren B ve T lenfositler diferansiasyona

dolaşımında devam ederler. Ortaya çıkan bu iki ana grubun görevleri farklıdır. T lenfositler hücrel immün cevapta rol alırken B lenfositlerin immün cevaptaki yeri humoraldir. T hücreleri antikor salgılamaz ancak B hücrelerinin salgıladığı antikorun miktar, cins ve afinitesini ayarlama da rol alırlar. B lenfositlerin antikorlarının da T lenfositler üzerinde kontrol edici etkisi vardır . Kemik iliği kaynaklı makrofajlar da antijen oluşumu, antijenlerin lenfositlere takdimi ve immünoregülasyonda görev alırlar. Özetle immün cevabın düzenlenmesinde T ve B hücreleriyle makrofajların rolleri birbirleriyle sıkıca ilişkilidir diyebiliriz (Şekil 1) 32.

B lenfositlerin ataları sitoplazmik immüoglobulinleriyle gebeliğin yedinci haftasından itibaren fetal karaciğerde tesbit edilebilirler. Dokuzuncu haftada ise yüzey immüoglobulinleri taşıyan hücreler fetal karaciğerde görülebilir. Erken fetal hayattan itibaren insan B lenfositlerinde yüzey immüoglobulini veya sitoplazmik immüoglobulin bulunabildiğinden B hücreleri için en iyi belirleyicinin immüoglobulinler olduğu söylenebilir. Yüzey immüoglobulini taşıyan B hücreleri 12-13. haftada fetal dalak periferik kanında bulunur ve devamlı olarak lenfoid dokuların germinal merkezleri ve kemik iliği tarafından antijenik uyarılara cevap olarak üretilirler. B lenfositlerin ortalama yarı ömürleri sekiz gündür 32.

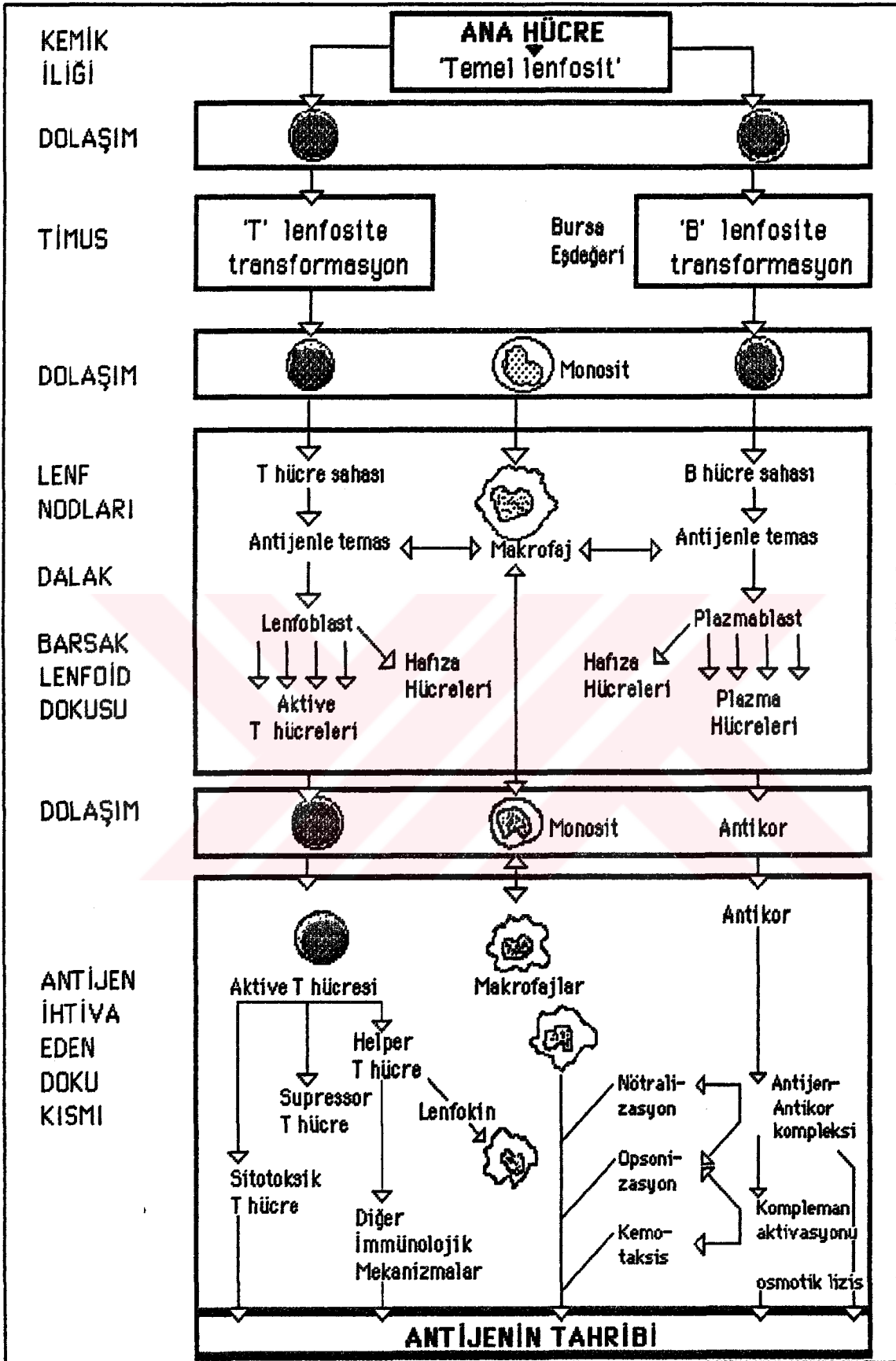
Timus ise fetal hayatın sekizinci haftasında üçüncü ve dördüncü brankial ceplerden gelişir. Kemiricilerde ve muhtemelen insanlarda da T hücrelerinin üç ana popülasyonu tanımlanmıştır : Protimositler, timositler ve immünokompetan T hücreleri 8. Kemiricilerde protimositler fetal karaciğer ve kemik iliğinden timusa geçerek bir dizi diferansiasyona uğrarlar 8,32. Hücreler korteksten medullaya geçerler, antijenleri değişir ve proliferer olurlar 32. Posttimik T hücrelerinin çoğu fonksiyonel olarak immatürdür ve periferik lenfoid organlarda olgunlaşırlar 8,32.

Insandaki T hücre matürasyonu daha az bilinmektedir. Timik lenfopoez insan fetusunda sekizinci haftada aktiftir. Timusta maksimum T hücre üretimi 16. ila 18. haftalar arasında olur. Dolaşıma giren T hücreleri 16. haftada dalakta görülmürler⁸. T hücrelerinin fonksiyonları bilinen yardımcı/uyarıcı ve öldürücü/baskılayıcı adı verilen alt grupları vardır^{8,30}. T hücrelerinin timustaki hayat süresi kısadır ancak periferde otuz yıl kadar yaşayabilirler³².

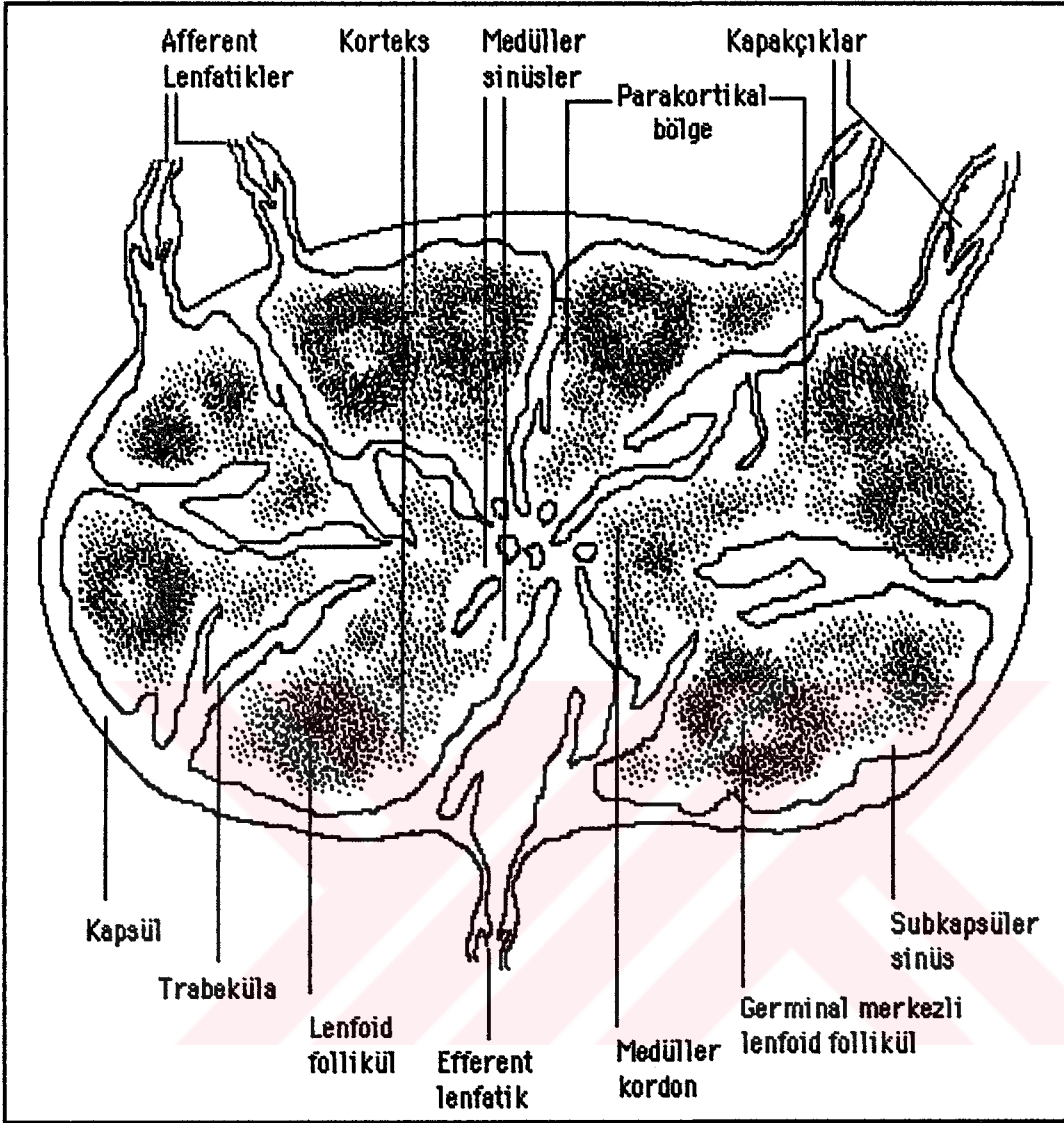
T ve B hücrelerinin vücutta belli lokalizasyonları vardır^{9,30,34}. T hücreleri lenf bezlerindeki parakortikal sahalarda ve dalakta beyaz pulpada arterler boyunca periarteryoler kılıfta yaşarlar. B hücreleri de lenf nodunda follikül germinal merkezlerinde, dalakta beyaz pulpada bulunurlar³². (Şekil 2)

T hücreleri genellikle dört saat süren bir devirle bütün vücudu dolaşırlar. Bu dolaşım T hücre zonlarındaki efferent lenfatiklerden başlar, duktus torasikus ve genel kan dolaşımını izledikten sonra gene lenf bezinde postkapiller ventüllerin uzun endotel hücreleri arasından geçerek başladığı yerde son bulur. Postkapiller ventül endotel hücreleri arasından geçişte hücre yüzey antijenleri önemlidir³².

B lenfositler ise daha oturaklıdır ve dokuda kalırlar. Bu da periferik kandaki %60-80'lik T lenfosit hakimiyetini açıklar^{9,32}.



Şekil 1. İmmün sistem hücrelerinin gelişimini ve birlikte çalışmalarını 49 .

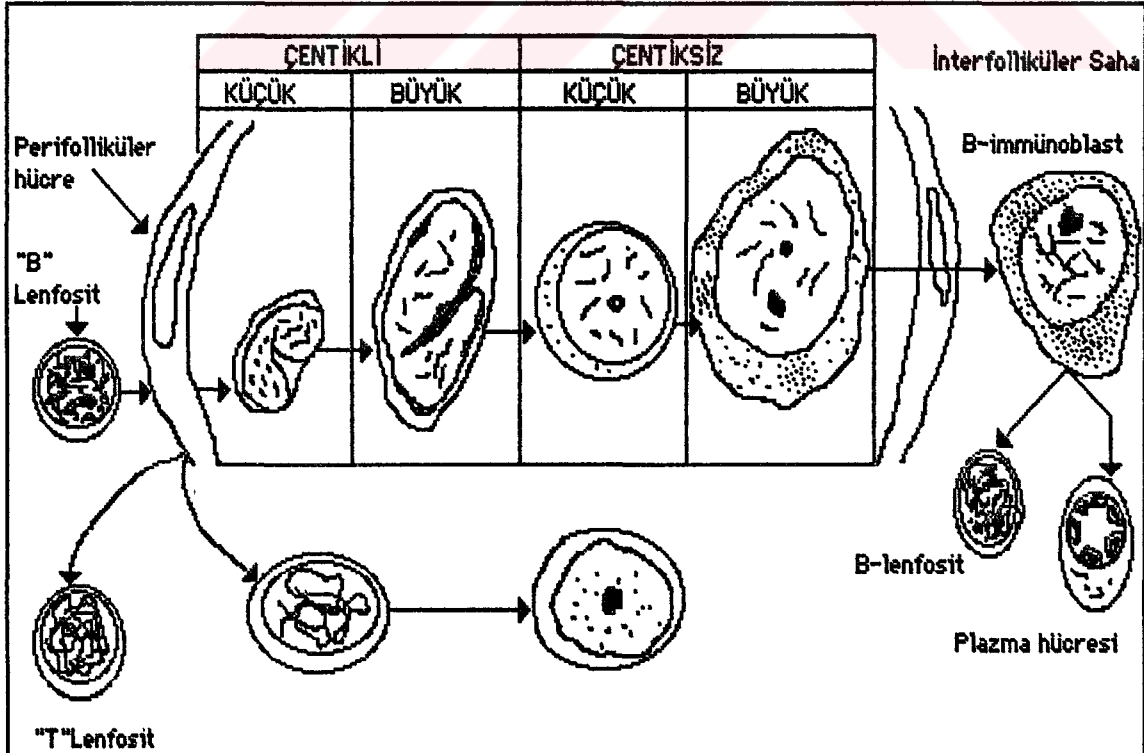


Şekil 2. Lenf bezinin şematik görünümü⁴⁹.

Lenfosit transformasyonu

Morfolojik olarak oldukça üniform bir yapıya sahip olan küçük lenfositler fonksiyonel olarak birbirinden farklı T ve B hücreleriyle her iki gruptan da olmayan "null" hücreler gibi ana gruplara ayrılırlar. Küçük lenfosit matür olmakla beraber bir son safha hücresi olmayıp uygun antijenik uyarıyla bazofilik sitoplazmalı, belirgin nükleoluslu daha büyük bir hücre haline geçebilir⁴¹. Bu hücre transforme lenfosit (immünoblast) olarak bilinir^{22,41}. Malign lenfomaların çok büyük bir kısmı B veya T hücre tipindedir. Gerçek histiyositik lenfomalar ise çok nadirdir²².

Küçük lenfosit, lenfositin uyuyan formunu temsil eder. Transforme lenfosit ise metabolik olarak aktif ve bölünen formudur. In vivo lenfosit transformasyonuna bir diferansiasyon olarak değil bir modülasyon olarak bakılmalıdır. Bu nedenle lenfoblast tabiri de biraz yanlışdır. Zira bu lenfositin primitif bir formunu değil sadece bölünen formunu temsil eder²². B lenfositler spesifik bir antijenik uyarıyı takiben metamorfoza uğrayarak büyük transforme lenfositlere, daha sonra immünoblastlara ve en sonunda plazma hücrelerine doğru değişirler^{22,42}. Antijenik uyarının kalkmasıyla tekrar eski hallerine dönerler²². B lenfosit transformasyonu özellikle folliküllerin merkezlerindeki hücrelerde ortaya çıkar⁴². Bu olaylar sırasında lenfositlerin spesifik formlarını morfolojik olarak tanımak mümkündür (Şekil 3)²². Bu hücrelere Lukes ve Collins follikül merkez hücreleri, Lennert ve grubu ise sentrosit-sentroblast adını vermişlerdir. Evvelce farklı hücreler oldukları sanılan küçük lenfosit, follikül merkez hücresi, immünoblast ve plazma hücresinin aslında aynı hücrenin farklı dönemleri oldukları artık bilinmektedir⁴².



Şekil 3. Follikül merkez hücre transformasyonu görüşünün şematik gösterimi²².

Istirahatteki bir organizmada dolaşımdaki lenfositlerin çoğu morfolojik olarak küçük lenfositlerdir. Antijenik uyarıyı takiben kısmen transforme lenfositler ve immünoblastların da dolaşımda görülmeleri mümkün olur. Lenfomalarda da buna benzer bir davranış vardır. Küçük hücreli lenfositik lenfomalarda kanda büyük oranda dolaşan hücre komponenti görülürken, follikül merkez hücreli lenfomalar lenf bezinde otururlar⁴².

Bu görüşler ışığında lenfositin üç temel formu olduğunu söylemek mümkündür:

1.T ve B hücre serisine ait uyuyan küçük lenfositler,

2.Transforme, bölünen lenfositler,

3.T ve B hücre sistemlerinin fonksiyonel hücreleri (B hücre serisindeki plazma hücreleri, T hücre serisindeki sitotoksik hücreler gibi)²².

Insan malign lenfomalarında olay lenfosit transformasyonunda bir blok ya da bir kısım hücrenin aşırı proliferasyonudur. In vitro transforme lenfositler normal follikül merkez hücrelerine çok benzerler. Camera lucida çalışmalarıyla bu zonda dört tip hücre ortaya konmuştur. Çentikli hücreler, çentiksiz hücreler, yıldızlı gökyüzü manzarası oluşturan fagositik histiyositler ve dendritik retikulum hücreleri²².

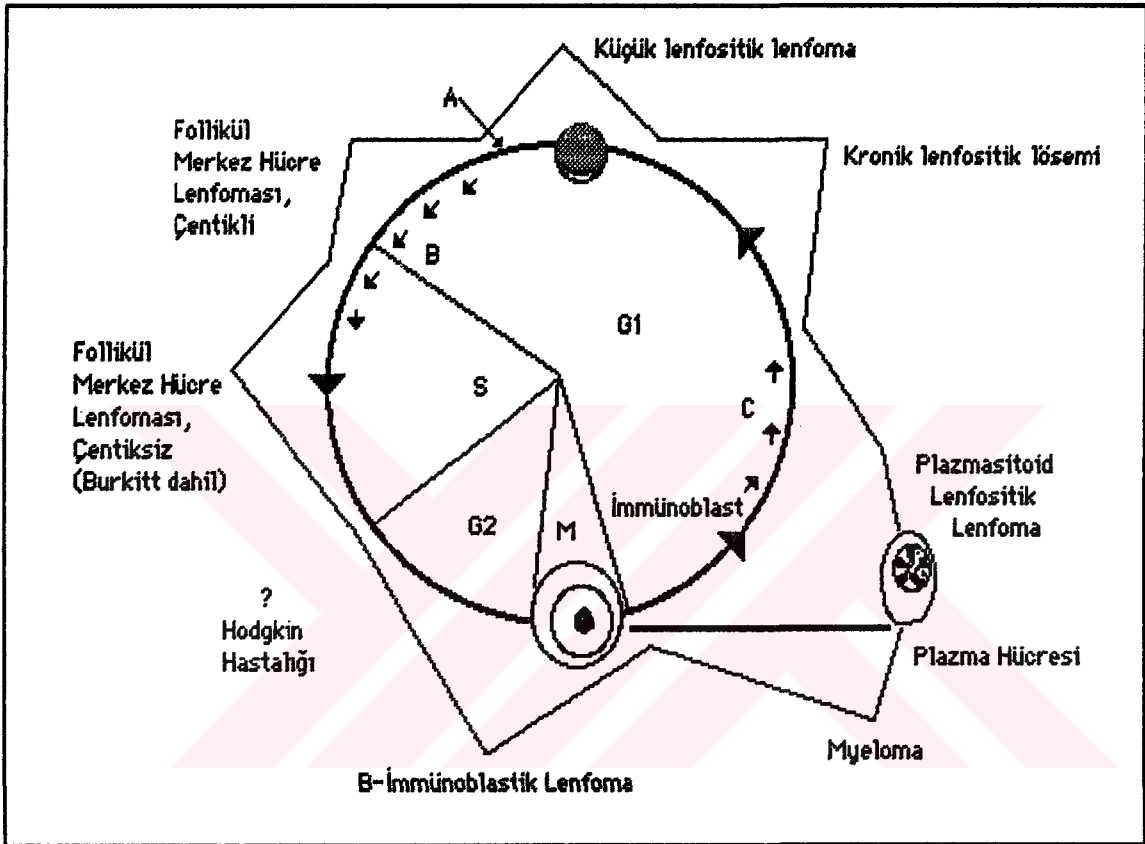
Normal lenfosit gibi lenfoma hücresi de hücre siklusu esnasında fonksiyonel ve morfolojik değişiklikler gösteriyor olmalıdır. Monoklonal hücre popülasyonunun tek tip hücreden oluştuğu yani monoklonalitenin monomorfite olduğu görüşü yanlıştır. Neoplastik hücreler de tıpkı normaldeki karşılıkları gibi transformasyon göstererek çoğalırlar. Bunun sonucunda bir lenfomada hakim olan bir hücre tipi yanında diğer hücreler de görülebilir⁴¹.

Hücre siklusu sırasında tümör hücresinin morfoloji ve fonksiyonlarında kaçınılmaz değişiklikler olur. Hücre büyür, nükleusta orantısız bir gelişme olur, S fazında protein sentezi ve RNA artımının bir göstergesi olarak sitoplazmik bazofili ortaya çıkar. Mitoz öncesinde G2 fazının karakteristiği olarak belirgin bir nükleolusa sahip immünoblast izlenir. Bu gibi hücrelerin sayısı proliferasyon hızının bir göstergesidir⁴¹.

Lenfomanın seyri esnasında bir organda farklı zamanlarda veya aynı anda; ya da farklı iki organda aynı anda iki farklı histolojik tipte lenfomanın bulunması karışık bir biyolojik fenomen oluşturur. Bu farklı komponentler neoplastik B lenfositin farklı matürasyon devreleriyle ilgilidir. Kompozit lenfoma adı verilen iki farklı histolojik tipteki lenfomanın bir arada bulunması çok nadir bir durumdur ve bu gibi olayların ekserisi aslında tek bir malign hücre tipinin farklı morfolojik ekspresyonlarıdır. Lenfomaların seyri esnasında vak'aların %16-35 kadarında histolojik tipler arasında geçiş görülür⁴⁶. Bir histolojik tipteki lenfomanın bir diğer tipe geçişi veya transmutasyonu hücre siklusundaki hakim hücre tipinin şifti ile kolayca anlaşılabilir. Bu gibi durumlarda neoplazm "vites değiştirmektedir"⁴¹.

Transformasyona uğrayan lenfositlerin her dört tipine ait neoplazmlar tarif edilmiştir. Farklı B hücrelerinin farklı tümörlerde görülmesi bu hücrelerden birinin nisbi üstünlüğü nedeniyle. Mesela küçük hücreli lenfomada hakim olan hücre tipi küçük hücreler, multipl myelomada ise plazmasitoid hücrelerdir. Ancak her tip lenfomada her tip hücre az da olsa görülür⁴². Değişik lenfoma tipleri arasındaki morfolojik farklar farklı orijinden gelme nedeniyle değil hakim olan hücrenin siklus fazı nedeniyle. Bu durumda immünoblastik lenfoma ile lenfositik malign lenfoma arasındaki fark da, benzerlik de yumurta ve tavuk ilişkisine benzer⁴¹.

Malign lenfomalar morfolojik özellikler, yüzey marker özellikleri ve davranışlarında benzedikleri lenfositler gibidirler ve lenfomaların farklı tipleri ile transformasyon olayı esnasında görülen farklı lenfosit morfolojik formları arasında bağlantı kurulabilir ⁴¹ (Şekil 4).



Şekil 4. B lenfositin hücre siklusu sırasındaki çeşitli morfolojik formlar ve bunlardan kaynaklanan neoplazmlar ²³.

Neoplastik bir lenfoid popülasyonun hücrelerini yorumlarken şunlara dikkat edilmelidir ⁴¹:

1. Popülasyona hakim olan hücre tipi: Bu tümörün morfolojisini ve davranışını etkiler;

2. Ana hücre tipi dışındaki diğer hücreler: Davranış ve morfolojideki ince ayrıntıları tayin ederler (immünoblastların tümörün büyüme hızını belirlemeleri gibi);

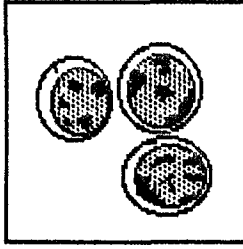
3.Aşık bir reaktif hücre komponentinin oluşu: Tümöre karşı immün cevabın bir göstergesi olabilir;

4.Foliküler bir yapının varlığı: Prognozla ilgili olabilir ve diferansiyon göstergesidir. Buna benzer bir görüş Rappaport tarafından daha 1956'da öne sürülmüş ve daha sonra birçok kez doğrulanmıştır ^{3,41,43}.

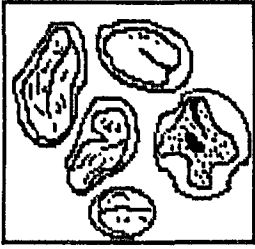
Lenfomaları B ve T hücreli olarak sınıflamanın klinik ve prognostik önemi vardır. Lenfomaların çoğunda tümörün tabiatını histopatolojik ve sitolojik kriterlere göre tahmin etmeye yardımcı olacak oldukça spesifik yapısal ve fonksiyonel kriterler tanımlanmıştır⁸. Değişik lenfoma tiplerinin B ve T hücre orijinlerine göre de ayırdedilebilmesini sağlayacak hücre morfolojik yapıları da tarif edilmiş bunların "camera lucida" çizimleri gerçekleştirilmiştir ²²(Şekil 5).

Lenfoma Sınıflamaları

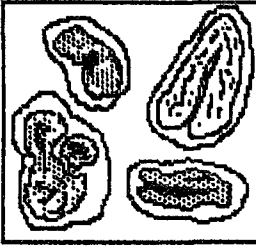
Genel olarak vücuttaki her tümör hücresinin bir progenitor hücresi olduğuna ve her bilinen hücre için de tanımlanabilir bir neoplazm olduğuna inanılır. Tümör sınıflamaları da genellikle kaynaklandıkları normal dokuların sınıflamalarına paralel olurlar. Bu nedenle immün sistem neoplazmalarının sınıflandırılabilmesi için immün sistem hücrelerinin iyi anlaşılması gerekir ⁴². İmmünoloji ve lenfopoez üzerindeki bilgi noksanlıkları nedeniyle malign lenfomalar 1950'li yılların ortalarına kadar bir ilerleme kaydetmemişler ancak bundan sonra T ve B lenfosit sistemleri üzerindeki bilgilerimizde büyük gelişmelerle beraber lenfoma üzerindeki bilgilerimiz de artmıştır. 1971 yılından itibaren de lenfomaların morfolojik tipleriyle immünofenotipleri üzerindeki çalışmalar birleştirilmeye başlanmıştır ²².



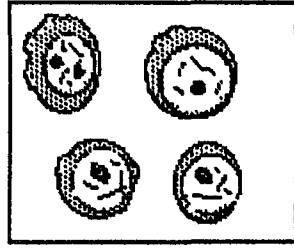
Küçük lenfositik lenfoma, B hücre



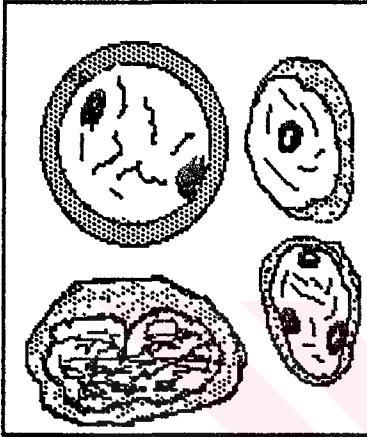
Küçük çentikli follikül merkez hücre lenfoması



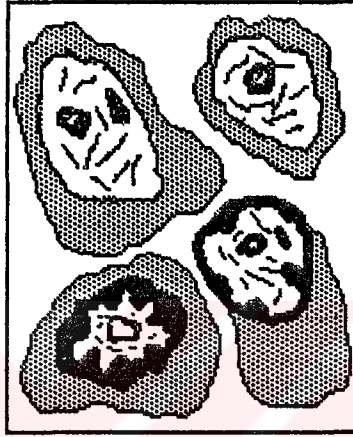
Büyük çentikli follikül merkez hücre lenfoması



Küçük çentiksiz follikül merkez hücre lenfoması



Büyük çentiksiz follikül merkez hücre lenfoması



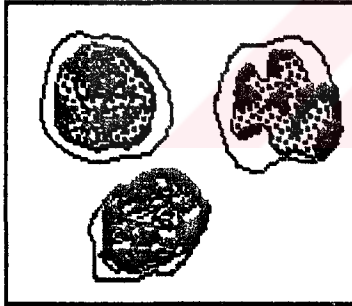
İmmünoblastik lenfoma, B hücre



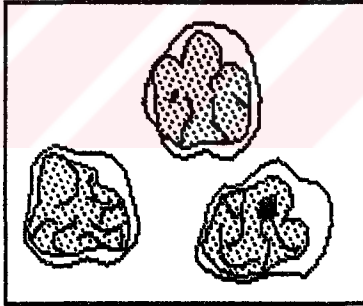
Plazmasitoid lenfositik lenfoma



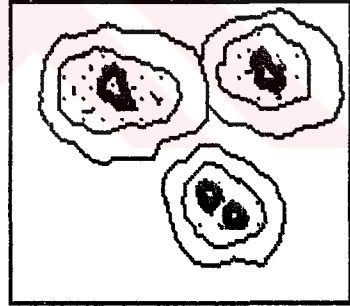
Hairy cell leukemia



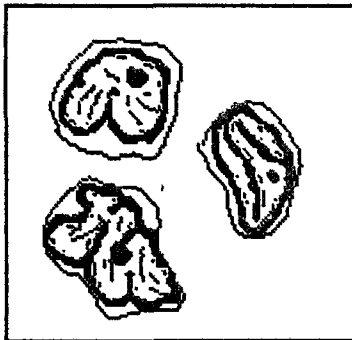
Küçük lenfositik lenfoma, T hücre



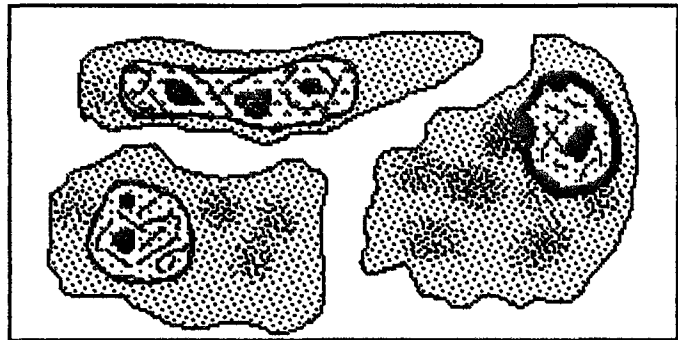
Kıvrıntılı T-hücre lenfoma



İmmünoblastik lenfoma, T-hücre



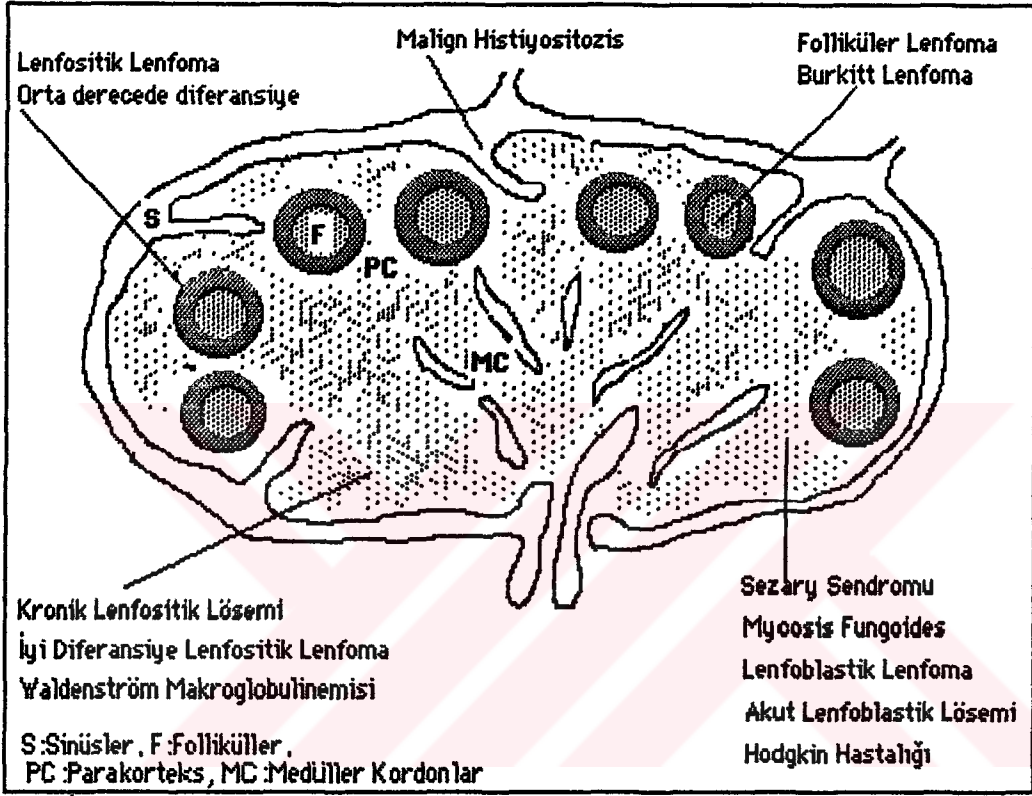
Mycosis fungoides ve Sezary hücre



Histiyoitik lenfoma

Şekil 5. Değişik B ve T lenfomaların "camera lucida" çizimleri ²².

Bazen lenfoma hücrelerinin morfolojik görünümünden başka neoplastik hücrelerin yerleşimi de tip tayinine yardımcı olabilir ^{32,37}. Bu noktadan hareketle bazı lenfopoetik tümörlerin en çok yerleştikleri lenf bezi bölgelerinin haritaları da hazırlanmıştır ³⁷ (Şekil 6).



Şekil 6. Lenf bezinin değişik bölgelerinden kaynaklanan neoplazmlar.

Yirminci asrın başlarından beri immün sistem ve hücreleri konusunda devamlı değişen görüş ve bilgiler nedeniyle Hodgkin dışı lenfomaların sınıflamaları üzerinde sürekli olarak değişiklikler yapılmıştır ^{32,37}. En son modifiye şeklini 1966'da alan Rappaport sınıflaması³⁶ tam genel kabul görmesinin eşğine gelmişken immünoloji alanındaki güçlü ilerlemelerle birdenbire eski bir hal almıştır ^{37,41}. Rappaport'un sınıflaması ihtiyaçtan kaynaklanan nedenlerle tamamen morfolojik temellere dayanıyordu ve pek çok çalışmada da bu sınıflamanın kullanılabilirliği ve klinik faydaları gösterilmişti ³⁷. Immünolojik yüzey markerları üzerindeki

çalışmalar lenfoma sınıflamaları hakkındaki görüşlerimize yeni bakış açıları getirmiştir ancak halen kusursuz bir sınıflama üzerinde anlaşılabilmiş değildir ⁴¹.

Öne sürülen elliden fazla sınıflamanın varlığı klinisyenlerle patoloğların ve hatta patoloğlarla patoloğların dahi anlaşamadıklarını göstermektedir ⁴¹.

Bu sınıflamalar arasında Rappaport sınıflaması kendinden öncekilere göre çok değerlidir ³⁶. Ancak bundan sonra sınıflamalara getirilen immünolojik bakış açısıyla Lukes-Collins ²³ ve Lennert ²⁰ sınıflamaları doğunca Rappaport sınıflamasında köklü değişiklikler meydana gelmiştir ⁴³. Ancak yeni sınıflamalardan pek çoğu klinik korelasyonlara dayandırılmamış her bir yeni antijenin bulunmasıyla modifiye edilmiştir ⁴³. Yeni teklif edilen sınıflamaların ekserisi sellüler immünolojinin daha iyi anlaşılmasına dayanmaktadır. Sadece histolojik sınıflamalar lenfoma sınıflamalarına bir temel oluşturamazlar. Bunu klinik ve immünolojik bilgilerle kombine etmek gerekir ⁴¹. Yani en değerli sınıflamalar immünolojik ve morfolojik kriterleri birlikte barındıranlar olmaktadır ^{13,42}.

Bunlar hep bir arayışın işareti sayılabilir. Hangi sınıflamanın klinikle daha uyumlu, daha üretken ve bilimsel olarak daha doğru olduğu da bilinmediğinden 1982'de "National Cancer Institute" o güne kadar yapılan sınıflamalardan en değerli ve en çok kullanılan (halen de öyledir) altısını geniş bir çalışmada ele alarak bunları birbirleriyle kıyaslamayı ve bir birlik temin etmeyi amaçladı. 1175 vak'a üzerinde Rappaport sınıflaması ³⁶, Lukes-Collins sınıflaması ²³, Kiel sınıflaması ²⁰, Dünya Sağlık Teşkilatı sınıflaması ²⁶, Dorfman sınıflaması ¹³, British National Lymphoma Investigation sınıflamasının ³ klinikle ilişkileri ve üretkenlikleri karşılaştırıldı. Sonuçların geniş kullanım alanı bulabilmesi ve pratik olması

amacıyla hiç bir immünolojik metodun kullanılmadığı ve sadece morfolojik yöntemlere yer verilen çalışmada varılan ana sonuç bütün sınıflamaların değerli olduğuydu . Hücre tipi ne olursa olsun folliküller yapının iyi prognoza işaret ettiği doğrulandı . Sonuçta sadece morfolojik kriterler zemininde lenfomaları on ana gruba ayıran bizim de kullandığımız bir formülasyon öne sürüldü . Bu formülasyon yeni bir sınıflama olmayıp her bir grubun histolojik özelliklerini tarif etmekte ayrıca değişik sınıflamalar arasında kıyası kolaylaştırmak için sinonimleri de ihtiva etmektedir ⁴³ (Tablo I).

Immünohistokimyasal yöntemler

Karmaşık tanı problemleriyle karşılaştıklarında uzun yıllar boyunca sadece konvansiyonel histokimyasal metodları kullanabilen patologlar, dokularda spesifik antijenlerin gösterilebilmesinin başlamasıyla beraber heyecan verici ilerlemeler kaydetmişlerdir ^{28,34}.

İlk defa 1942'de Coons ve arkadaşlarının ortaya attığı immünofloresans metodlar günümüzde de yaygın olarak kullanılmakta olup, halen özellikle böbrek biyopsilerinde immünooglobulinler ve komplemanın gösterilmesi için patoloji laboratuvarlarının rutin teknikleri arasında yer almaktadırlar ³⁴. Floresein izotiyosiyanatın (FITC) stabil bileşiklerinin üretilmesi ve FITC ile antikor bileşiklerinin hazırlanmasıyla floresan antikor tekniği doğmuştur ⁴⁰.

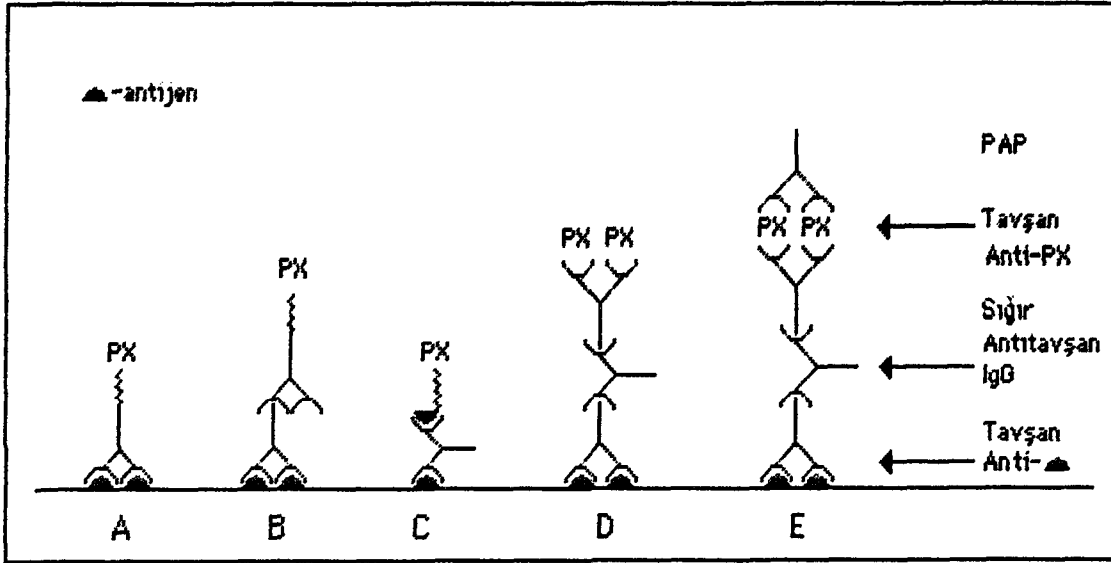
Table 1. Kodların -değişik Lenfomalar İçin Working Formulation'a Eksen Olan Sınıflandırmaların Sınırları

FORMULATION	WHO	WORKING	DIFFERENTIAL	KEY	COLLINS	REPORT	WHO
A *ML, küçük lenfositik -KLL'ye eşik eden -plazmasitoid		*Diffüz, lenfositik, iyi diferansiyel	*Küçük lenfositik	*Lenfositik, KLL ve lenfoplazmasitik/ lenfoplazmasitoid	*Küçük lenfositik ve plazmasitoid lenfositik	*Lenfositik, iyi diferansiyel	*Lenfositik
B *ML, folliküler, küçük, çentikli hücrelerin diffüzyon sahasıyla birlikte sklerozis		*Folliküler lenfoma, küçük hücre hakim	*Folliküler, küçük lenfoid	*Folliküler, sentroblastik-sentrositik	*Folliküler ve/veya diffüz, küçük çentikli follikül merkez hücreli folliküler	*Nodüler, kötü diferansiyel, lenfositik	*Nodüler, prelenfositik
C *ML, folliküler, küçük çentikli ve büyük hücre karışık diffüzyon sahası sklerozis		*Folliküler lenfoma, küçük ve büyük hücre karışık	*Folliküler, büyük lenfoid hücre karışık	*Folliküler, sentroblastik-sentrositik (küçük)	*Folliküler, küçük çentikli, küçük çentikli FCC ile büyük çentikli FCC	*Nodüler, lenfositik ve histiyositik karışık	*Nodüler, prelenfositik-lenfoblastik
D *ML, folliküler, büyük hücre hakim diffüzyon sahası sklerozis		*Folliküler lenfoma, büyük hücre hakim	*Folliküler, büyük lenfoid	*Folliküler, sentroblastik-sentrositik (büyük)	*Folliküler, büyük çentikli ve/veya çentiksiz	*Nodüler, histiyositik	*Nodüler, prelenfositik-lenfoblastik
E *ML, diffüz, küçük çentikli sklerozis		*Diffüz, lenfositik, orta derece dif.	*Diffüz, küçük lenfoid	*Küçük sentrositik	*Diffüz, küçük çentikli follikül merkez hücreli	*Diffüz, lenfositik	*Diffüz, prelenfositik
F *ML, diffüz, küçük ve büyük hücre karışık sklerozis		*Diffüz, küçük ve büyük hücre karışık	*Diffüz, küçük ve büyük lenfoid karışık	*Diffüz, sentroblastik-sentrositik ve lenfoplazmasitoid, polimorfik	*Diffüz, küçük çentikli, büyük çentiksiz follikül merkez hücreli	*Diffüz, lenfositik karışık	*Diffüz, prelenfositik-lenfoblastik
G *ML, diffüz, büyük hücreli epiteloid hücre komponentli çentikli hücreli çentiksiz hücreli sklerozis		*Diffüz, indifferansiyel büyük hücreli (büyük lenfoid hücre)	*Diffüz, büyük lenfoid	*Diffüz, sentroblastik-sentrositik (büyük)	*Diffüz, çentiksiz veya çentiksiz follikül merkez hücreli	*Diffüz, histiyositik	*Diffüz, lenfosarkom prelenfositik-lenfoblastik
H *ML, büyük hücreli, lenfoblastik plazmasitoid polimorföz berrak hücreli epiteloid hücre komponentli		*Diffüz, indifferansiyel büyük hücreli (Lenfoid hücre, plazma hücre)	*Diffüz, büyük lenfoid, plazma hücre	*Lenfoblastik ve T-sen lenfoma	*T veya B lenfoblastik sarkom	*Diffüz, histiyositik	*Diffüz lenfosarkom lenfoblastik
I *ML, lenfoblastik kavrutalı hücreli kavrutuz hücreli		*Diffüz, lenfositik, kötü diferansiyel (lenfoblast)	*Lenfoblastik, kavrutalı, kavrutuz	*Lenfoblastik, kavrutalı veya sınıflandırmayan Burkitt tip	*Kavrutalı T hücre	*Lenfoblastik, kavrutalı/ kavrutuz	*Diffüz lenfosarkom lenfoblastik
J *ML, küçük çentiksiz hücreli Burkitt folliküler sahalı		*Diffüz, lenfositik, kötü diferansiyel Burkitt ve Burkitt-dışı	*Burkitt lenfoma	*Burkitt tip lenfoblastik veya diğer B-lenfoblastik	*Küçük çentiksiz follikül merkez hücreli	*Burkitt indifferansiyel Burkitt ve Burkitt olmayan	*Burkitt tümörü
K *Diğer lenfomalar -korpöz lenfoma -mikozis fungoides -histiyositik lenfoma -ekstramedüller plazmasitom -sınıflandırmayanlar -diğerleri							

İmmünofloresan metodların diyagnostik patoloji ve araştırma patolojisinde yaygın olarak kullanılması immünoloji ve immünopatolojide büyük ilerlemeler sağlamış, ancak immünofloresan metodların kötü morfolojileri ve kalıcı olmayışları nedeniyle daha tatminkar alternatif metodlara ihtiyaç doğmuştur. Bunun üzerine pek çok metod ortaya atılmış ancak herbirinin kendine has sakıncaları olması nedeniyle bir dizi modifikasyonla nihayet immünoperoksidaz teknikler geliştirilmiştir ⁴⁰. Halen de modifiye olmaya devam eden immünoperoksidaz teknikler 1966'dan itibaren patoloji laboratuvarlarına girmiştir ¹⁴.

Peroksidazla işaretlenen immünolojik boyama uygulamalarının immünofloresan metodlara göre belirgin bazı avantajları vardır⁴⁰. İmmünoperoksidaz teknikler hem taze donmuş dokulara, hem hücre süspansiyonlarına, hem de formalinle tesbit edilip rutin işlem görmüş dokulara uygulanabildikleri için immünofloresan metodlara üstündürler. İmmünoperoksidaz teknikler için normal ışık mikroskobu yeterli olur, hematoksilenle zıt boyama sayesinde iyi bir morfolojik ayrıntı elde edilir, parafin bloklara uygulanabildiğinden geriye dönük çalışma yapılması mümkündür. İmmünoperoksidaz teknikler elektron mikroskopisine de uygulanabilir ve hassasiyetleri radioimmunoassay çalışmaları kadar yüksektir ^{12,28}. Ancak immüno globulinlerin gösterilmesi ve monoklonalite tayininde immünofloresanın immünoperoksidaz yöntemlere üstün olduğuna dair çalışmalar da vardır ^{45,46}.

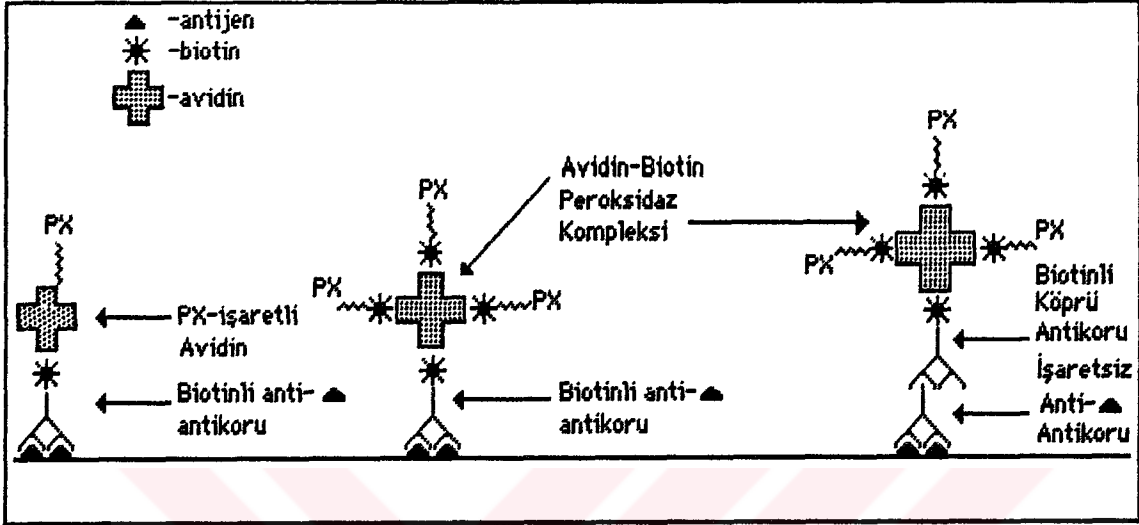
İmmünofloresan ve immünoperoksidaz tekniklerin en primitifleri direkt ve indirekt metodlar olup birbirlerinin aynıdır ¹². Direkt ve indirekt metodların bazı dezavantajları olması sebebiyle düzeltilmiş konjuge metodlar geliştirilmiştir . Öne sürülen pek çok metod arasında en yaygın kullanım alanını peroksidaz antiperoksidaz metodu bulmuştur ¹⁴ (Şekil 7).



Şekil 7. İmmünoperoksidaz metodlar. A, Konjuge peroksidaz - antikor metodu, direkt; B, konjuge peroksidaz - antikor metodu, indirekt; C, işaretli antikor metodu; D, enzim köprü metodu, E, peroksidaz - antiperoksidaz (PAP) immün kompleks metodu 14 .

İmmünohistokimyasal çalışmalarda Hsu ve arkadaşlarının teklif ettikleri avidin-biotin peroksidaz kompleks metodunun daha sensitif olduğu yayınlanmış^{18,19} ve daha sonra geniş kullanım alanı bulmuştur^{4,14}. Avidin biotin peroksidaz metodunun peroksidaz antiperoksidaz metoduna göre 40 kat daha hassas olduğu bildirilmiştir¹⁸. Avidin molekül ağırlığı 68000 olan biotine karşı afinitesi yüksek dört bağlama yerine sahip bir yumurta akı glikoproteindir^{14,19}. Bu metodla üç kademeli bir teknik kullanılarak işaretli primer antikor ve avidin-biotin peroksidaz kompleksi arasında biotinle işaretli sekonder antikor bir köprü olarak kullanılmaktadır^{14,19}. (Şekil 8) Üç kademeli bu teknikle hassasiyet artırılırken primer antikor da daha dilüe olarak kullanılabilir^{14,18,19}. Bu yüksek sensitivite çok sayıda peroksidaz molekülü sayesinde bir kafes meydana gelişine bağlıdır^{14,19}. Bu yöntemle dokudaki her bir antijen için üç ayrı noktadan peroksidaz aktivitesi görüntülenebilmektedir. Biotin ve avidin kullanan

immünohistokimyasal teknikler araştırma sistemlerinin en ümit vericilerindendir. Zira spesifik boyanmalarının zemin boyanmasına oranları yüksektir yani iyi kontrast verirler¹⁴.



Şekil 8. Avidin - biotin peroksidaz teknikleri¹⁴.

Aranmakta olan antijen bu şekilde spesifik olarak işaretlendikten sonra peroksidaz - 3,3' diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) tekniğiyle görüntünün elde edilmesi sağlanır . Ortama eklenen H_2O_2 'den O_2 salınımını katalize eden peroksidaz DAB'nin okside olmasına yol açtığından ortaya kahverengi olarak görülen çözünmez bir polimer çıkar^{28,34}. Bu şekilde görüntü elde edildikten sonra kesitler herhangi bir preparat gibi rutin şekilde ksilol ve alkollerle dehidrate edilip şeffaflaştırılabilirler ve sentetik resinle kapatılabilirler . DAB'nin potansiyel bir karsinojen olduğu bilindiğinden yerine 3-amino 9-etil karbazol (AEC) gibi daha kırmızı kahverengi renk veren substratlar da kullanılabilir . Ancak AEC ksilol gibi solventlerde eriyebildiğinden kesitler sudan çıkarıldıktan sonra gliserin jeli ile kapatılmalıdır³⁴.

İmmünohistokimyasal olarak aranan antijenin gösterilebilmesi boyanan antijen ile çevredeki diğer maddeler arasında kontrast elde edilmesine bağlıdır ⁴⁰. İdeal olarak metod sadece aranan antijen sahasında boyanma vermelidir . Ancak pek çok faktör bu boyanmayı karıştırır ³⁴.

Endojen peroksidaz aktivitesi yorumlamayı güçleştirebilir. Bu taze donmuş kesitlerde daha belirgin olarak karşımıza çıkar. Lökosit granülleri ve hemoglobinin belirgin peroksidaz aktivitesi vardır ²⁸. Endojen peroksidazın bloke edilmesi amacıyla % 3'lük H₂O₂ kullanılır ¹². Zemin boyanmasının sebepleri arasında fiksasyondan önce sorumlu maddenin hücre dışına difüzyonu da yer alır ^{28,40}. Kullanılan antijenin spesifitesi az olabilir, bu sorun monoklonal antikörlerle en aza indirilmiştir . Kollagen ve retikulum lifleriyle nekroz sahalarında da belirgin olarak zemin boyanması izlenir . Çok kademeli teknikler ve primer antikörün dilüe olarak kullanılması ile zemin boyanması problemleri en aza indirgenebilir ^{34,40}. Bundan başka iyi bir deparafinizasyon yapılmaması da zemin boyanmasına yol açacağından ksilol ile deparafinizasyondan evvel kesitlerin 56°C'yi geçmemek şartıyla ısıtılması yararlı olur ¹².

İmmünohistokimyasal metodlarda en önemli konulardan biri de kullanılan primer antikördür. Primer antikör olarak farelerden hazırlanan monoklonal antikörlerin konvansiyonel antiserumlara göre belirgin üstünlükleri vardır. Monoklonal antikörler seçilmiş hibrid hücre klonlarından istenildiği kadar elde edilebilir ve monoklonal antikörlerdeki yüksek spesifite zemin boyanmasını azaltır. Aynı kaynaktan çok miktarda standardize edilmiş antikör üretilerek farklı merkezlerdeki çalışmaların kıyaslanması imkanı elde edilir. Konvansiyonel

antikorlarla yapılması zor olan bir dizi antijene karşı seri olarak antikor üretilmesi işlemi monoklonal antikorlarda kolaydır ¹⁴.

Ancak monoklonal antikorların spesifiteleri sadece tek bir antijenik determinanta karşıdır . Monoklonal antikorların taze donmuş kesitlerde veya hücre süspansiyonlarında tesbit ettikleri antijenleri parafin kesitlerde gösteremedikleri olmaktadır . Bu muhtemelen monoklonal antikorun tanıdığı antijenik determinantın denatürasyonuna bağlıdır . Oysa birkaç determinanta karşı farklı antikorların karışımından meydana gelen bir konvansiyonel antikor parafin blok doku kesitlerinde daha başarılı olabilir ¹⁴.



MATERYAL VE METOD

1988 yılı Ocak ayından 1990 yılı Aralık ayına kadar Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gelen ve Hodgkin dışı lenfoma tanısı verilen toplam 34 lenf bezi materyalini inceledik. Parafin blokların tamamı %10'luk tamponlanmamış formalinde tesbit edilmişlerdi. Bütün bloklardan hematoksilen eozinle boyanmış kesitler hazırlayıp vak'aları "International Working Formulation"a (IWF) göre sınıflandırdık ⁴³. Parafin bloklardan 6-8 mikronluk kesitler alarak immünohistokimyasal olarak "Leucocyte common antigen" (LCA), pan B antijeni 4KB5, pan T antijeni UCHL1, immünooglobulin G, A ve M'ye karşı antikorlarla immünohistolojik çalışma yaptık. Kesitler alındıktan sonra lamdan dökülmemeleri için sıcak su havuzuna distile suda hazırlanmış % 5'lik jelatin ilave ettik. Kesitleri 56 °C lik etüvde daha iyi bir deparafinizasyon için ısıttık. Ksilol ve derecesi giderek azalan alkollerden geçirip deparafinize ve rehidrate ettiğimiz kesitlere suda yıkandıktan sonra immünohistolojik boyama uyguladık. Çalışmamızda daha hassas olduğu bildirilen ^{18,19} ve yaygın olarak kullanılan avidin-biotin peroksidaz kompleks metodunu tercih ettik.

Çalışmada kullandığımız LCA, 4KB5 ve UCHL1 antikorları monoklonal fare, immünooglobulin antikorları ise poliklonal tavşan antikorlarıydı (LCA, Ig G, Ig A ve Ig M antikorları ImmuStain-DPC; 4KB5 ve UCHL1 antikorları Immunon-Lipshaw).

Avidin-biotin peroksidaz yöntemini şu şekilde uyguladık^{12,14,18,32,37}:

1.Endojen peroksidaz aktivitesinin blokajı için kesitleri %0.3'lük H₂O₂ ile 5 dakika inkübe ettik.

2.Kesitleri 5 dakika fosfatla tamponlanmış salin (PBS) solüsyonunda yıkadık.

3.Spesifik olmayan proteinlerin blokajı için kesitleri 20 dakika süreyle protein bloke edici ajanla inkübe ettik. Bu işlemi sadece monoklonal antikorlara uyguladık.

4.Kullanılan protein bloke edici ajanın fazlasını alıp primer antikorunu uyguladık. Primer antikor monoklonal antikorlarda 60 dakika, poliklonal antikorlarda 30 dakika süreyle uygulandı.

5.Kesitleri 5 dakika PBS ile yıkadık.

6.Kesitleri kullanılan primer antikorun cinsine uygun (monoklonal veya poliklonal) bağlayıcı köprü ajanla 30 dakika inkübe ettik.

7.Kesitleri 5 dakika PBS ile yıkadık.

8.Dokuları sekonder antikor olarak avidin enzimiyle 30 dakika muamele ettik.

9.Kesitleri 5 dakika PBS ile yıkadık.

10.Kesitlere bu aşamada renk verici olarak AEC için 10-15 , DAB için 5-10 dakika süreyle AEC veya DAB uyguladık.

11.Bundan sonra çeşme suyuyla yıkanan kesitler, Mayer hematoksilen ile 1-2 dakika zıt renkte boyanıp DAB kullanılmışsa alkoller ve ksilollerden geçirilerek rutin şekilde, AEC kullanılmışsa sudan sonra gliserin jeliyle kapatıldı.

Kesitlerin kurumamaları için bütün işlemler hazırlanan küçük bir nemli odada gerçekleştirildi.

Hazırlanan hematoksilen eozin ve immünohistokimya preparatları normal ışık mikroskopunda değerlendirildi. Bütün vak'alar IWF'a göre sınıflandırıldı.

Antijenik boyanmada sistem ileri derecede hassas olduğundan boyanmanın şiddeti değil kaç hücrede pozitif olduğu göz önüne alınarak boyanan hücrelerin oranına göre vak'alar aşağıdaki şekilde skorlandı (Tablo II, Resim 1).

SKOR	ANLAMI
-	Hiç boyanan hücre yok
±	%5'ten az hücre boyanmış
+	%5-25 arası hücre boyanmış
++	%25-50 arası hücre boyanmış
+++	%50-75 arası hücre boyanmış
++++	%75'ten fazla hücre boyanmış

Resim 1. Vak'aların skorlanması. İmmünohistokimyasal olarak yapılan boyamada değişik derecelerdeki reaksiyonlara örnekler. Üst sıra; solda (+), sağda (++) , alt sıra; solda (+++), sağda (++++) olarak değerlendirilen vak'alar (Hematoksilenle zıt boyanmış immünohistokimyasal metod x1000).

BULGULAR

Vak'alar IWF'a göre sınıflandı. Buna göre vak'alarımızın büyük çoğunluğunu immünoblastik ve büyük hücreli lenfomanın oluşturduğu bulundu (sırayla %26.47 ve %23.53). Bunları %14.71'lik oranlarıyla lenfoblastik lenfoma ile küçük ve büyük hücrelerin karışık olduğu lenfoma vak'aları izledi. % 11.76 lık yer tutan küçük lenfositik lenfomadan sonra da diffüz küçük çentikli lenfoma görüldü. (Tablo III)

TANI KODU	TANI	VAK'A ADEDİ	ORAN (%)
A	ML,küçük lenfositik	4	11.76
E	ML,diffüz,küçük çentikli	1	2.94
F	ML,diffüz küçük ve büyük hücre karışık	5	14.71
G	ML,diffüz büyük hücreli	8	23.53
H	ML,büyük hücreli,immünoblastik	9	26.47
I	ML,lenfoblastik	5	14.71
J	ML,küçük hücreli çentiksiz	2	5.88

LCA'nın pozitiflik oranı % 97 (33/34) olarak bulundu. 4KB5 ve UCHL1 değerlendirilirken bir antijenin pozitif diğerinin negatif olduğu vak'alar ile bir antijenin diğerine belirgin hakimiyetinin olduğu vak'alar hakim olan antijen lehine değerlendirildi.

Immünohistokimyasal çalışmalar sonucu elde edilen sonuçlar toplu halde Tablo IV'te verilmiştir.

Tablo IV. Genel Sonuçlar

BİYOPSİ NO.	YAS	CINS	ORGAN	HIST TANISI	İMMÜNOHİST. PROFİL							YORUM
					LCA	B	T	Ig G	Ig A	Ig M		
250-88	60	K	Lenf bezi	F	++	+++	+	+	-	±	B-ML, difüz, küç. ve büy. h. karışık	
283-88	9	E	Submand. l.b.	I	±	++	-	+++	+	+	B-ML, lenfoblastik	
865-88	22	K	Servikal l.b.	F	++	+++	+++	+	+++	-	B ve T-ML, dif. küç. ve büy. h. karışık	
1992-88	6	E	Lenf bezi	J	++	+	++	±	-	±	T-ML, küçük çentiksiz hücreli	
3941-88	74	E	Lenf bezi	H	++++	++++	+	+	+	+	B-ML, immünoblastik	
4373-88	46	E	Servikal l.b.	F	+++	+++	+	-	+	+	B-ML, difüz küç. ve büy. h. karışık	
4525-88	12	E	Servikal l.b.	J	+++	++	+	-	++	+	B-ML, küçük çentiksiz hücreli	
4717-88	48	E	Lenf bezi	H	+++	+++	+	+	+++	+++	B-ML, immünoblastik	
4755-88	83	E	Servikal l.b.	I	+++	++++	+	+++	+++	+++	B-ML, lenfoblastik	
672-89	25	K	Servikal l.b.	A	+++	+++	+	+++	++	+++	B-ML, küçük lenfositik	
694-89	41	K	Aksiller l.b.	A	++	+++	-	+++	+++	-	B-ML, küçük lenfositik	
1014-89	4	E	Servikal l.b.	G	+	++	+	+++	+++	+++	B-ML, difüz büyük hücreli	
1032-89	54	K	Servikal l.b.	H	+	++	++	+	+	+	B ve T-ML, immünoblastik	
1463-89	50	E	Servikal l.b.	G	+	-	++	-	-	-	T-ML, difüz büyük hücreli	
2133-89	5	E	Abdominal l.b.	H	+	+	+	++	++	+++	B ve T-ML, immünoblastik	
2459-89	2.5	E	Abdominal l.b.	I	+	±	-	+++	+	+	B-ML, lenfoblastik	
4187-89	30	E	Lenf bezi	H	++	++	-	++	-	-	B-ML, immünoblastik	
4505-89	80	E	Inguinal l.b.	H	+	+	-	-	-	-	B-ML, immünoblastik	
4794-89	7	E	Pektoral l.b.	G	++	+++	++	+++	+	+	B-ML, difüz büyük hücreli	
5288-89	21	K	Abdominal l.b.	F	+	++	++	+++	+++	-	B ve T-ML, dif. küç. ve büy. h. karışık	
168-90	53	E	Servikal l.b.	G	++	++	+	+++	++	+	B-ML, difüz büyük hücreli	
318-90	58	E	Lenf bezi	A	+++	++++	+	-	-	-	B-ML, küçük lenfositik	
510-90	65	K	Servikal l.b.	A	+++	++	-	+	+	-	B-ML, küçük lenfositik	
629-90	30	K	Mediastinal l.b.	I	++	++	+	+	+	+	B-ML, lenfoblastik	
960-90	53	E	Lenf bezi	G	+++	+++	++	+++	+++	+	B-ML, difüz büyük hücreli	
1047-90	?	E	Lenf bezi	H	++++	+++	+	+++	-	-	B-ML, immünoblastik	
1861-90	34	E	Mediastinal l.b.	G	+	+	++	+++	+++	+++	T-ML, difüz büyük hücreli	
2169-90	51	K	Lenf bezi	F	++	++	+	+	+	-	B-ML, difüz küç. ve büy. h. karışık	
2432-90	67	K	Lenf bezi	H	++++	++	+	+++	+++	+++	B-ML, immünoblastik	
3648-90	54	E	Supraklav. l.b.	H	+	++	-	+++	++	-	B-ML, immünoblastik	
5248-90	58	E	Lenf bezi	E	-	++	++	+++	+	+	B ve T-ML, küçük çentikli	
5385-90	64	E	Lenf bezi	G	++	++	+++	+++	-	-	T-ML, difüz büyük hücre	
5893-90	62	E	Inguinal l.b.	I	+	++	+++	+++	+++	+++	T-ML, lenfoblastik	
6176-90	44	E	Lenf bezi	G	++	+++	++	+++	+++	+++	B-ML, difüz büyük hücre	

Bu sonuçlara göre vak'aların % 70.6'sını B lenfoma (Resim 2), % 14.7'sini T lenfoma (Resim 3) olarak değerlendirirken kalan 5 vak'ada (% 14.7) B ya da T hücre lenfoması yönünde bir ayrıma gidemedik (Resim 4) (Tablo V).

ANTIJEN PROFILI	VAK'A SAYISI	ORAN (%)	YORUM
B+,T- olan vak'alar	7	20.6	B lenfoma
T+,B- olan vak'alar	1	2.94	T lenfoma
B>T olan vak'alar	17	50.0	B lenfoma
T<B olan vak'alar	4	11.76	T lenfoma
B=T olan vak'alar	5	14.7	Sınıflanamadı
TOPLAM	34	100.0	

B ve T lenfoma sınıflaması ile IWF sınıflamasını karşılaştırdığımızda sınıflandırılmayan beş vak'anın ikisinin küçük ve büyük hücreli karışık lenfoma (%40), ikisinin immünoblastik lenfoma (%40), kalan birinin de (%20) küçük hücreli çentikli lenfoma olduğunu izledik (Tablo VI).

B lenfoma grubuna giren vak'alar arasında (toplam 24) en büyük çoğunluğu yedi vak'a ile (%29.17) immünoblastik lenfomaların aldığını bulduk. Bunu beş vak'a ile (%20.83) büyük hücreli lenfomalar, dörder vak'a ile (%16.67) lenfoblastik ve küçük hücreli lenfositik lenfomalar ve üç vak'a ile (%12.5) küçük ve büyük hücreli karışık lenfomalar izlerken B lenfomalar arasındaki en küçük grubu bir vak'a ile (%4.16) küçük çentiksiz hücreli lenfomalar oluşturdu (Tablo VI).

Beş T lenfoma vak'asının IWF tanılarına göre dağılımı ise; üç büyük hücreli lenfoma (%60), bir lenfoblastik lenfoma (%20) ve bir küçük çentiksiz hücreli lenfoma (%20) şeklinde bulundu (Tablo VI).

Tablo VI. Histopatolojik tanılarına göre B ve T lenfomaların dağılımı					
TANI KODU	TANI	VAK'A SAYISI	B-HDL	T-HDL	SINIF- SIZ
A	Küçük lenfositik	4	4	-	-
E	Küçük h.li çentikli	1	-	-	1
F	Küçük ve büyük h.li	5	3	-	2
G	Büyük hücreli	8	5	3	-
H	İmmünoblastik	9	7	-	2
I	Lenfoblastik	5	4	1	-
J	Küçük h.li çentiksiz	2	1	1	-
TOPLAM		34	24	5	5

B-HDL: B Hodgkin-dışı lenfoma

T-HDL: T Hodgkin-dışı lenfoma



Resim 2. B hücre serisine ait olduğu görülen Hodgkin-dışı lenfoma vak'ası. Üst sıra; solda hematoksilen eozin, sağda LCA ile, alt sıra; solda 4KB5, sağda UCHL1 ile yapılan boyamalar. Vak'ada LCA'nın pozitif olduğu, 4KB5 ile boyanmanın belirgin bir şekilde UCHL1'den fazla olduğu izlenmektedir (Hematoksilenle zıt boyanmış immünohistokimyasal metod x1000).



Resim 3. T hücre serisine ait bir Hodgkin-dışı lenfoma vak'ası. Üst sıra; solda hematoxilen eozin, sağda LCA ile, alt sıra; solda 4KB5, sağda UCHL1 ile yapılan boyamalar. Vak'ada LCA'nın pozitif olduğu, UCHL1 ile boyanmanın belirgin bir şekilde 4KB5'ten fazla olduğu izlenmektedir (Hematoxilenle zıt boyanmış immünohistokimyasal metod x1000).

Resim 4. B veya T hücre serisi yöntünde ayırım yapılamayan bir lenfoma vak'ası. Üst sıra; solda hematoksilen eozin, sağda LCA ile, alt sıra; solda 4KB5, sağda UCHL1 ile yapılan boyamalar.4KB5 ve UCHL1 ile yapılan boyamalar arasında belirgin bir fark gözlenmemektedir.(Hematoksilenle zıt boyanmış immünohistokimyasal metod x1000).

İmmüoglobulinlere karşı yapılan boyamalarda % 57.84 oranında (59/102) zemin boyanması gördük.

Monoklonal antikorlardaki %1.96'lık (2/102) zemin boyanmasına karşılık, poliklonal antikorlardaki zemin boyanmasının % 57.84 (59/102) olduğunu izledik.

TARTIŞMA

Son yılların immünolojik gelişmeleri lenfomalar konusundaki görüşlerimizi çok büyük oranda yenilemiştir . Artık bu tümörleri pek çok fizyolojik ve hücre yüzey özellikleri normaldeki karşılıklarına benzeyen immün sistem tümörleri olarak tanıyoruz³³ .

Immünohistokimyasal yöntemler önceleri sadece taze donmuş dokulara uygulanabilirken daha sonra formalinde fikse parafinde bloklanmış dokularda da reaksiyon verebilen antikorların bulunması çalışma alanını çok büyük oranda genişletmiştir¹⁰ . Patolog rutin hematoksilen eozin preparatını inceleyip spesifik bir antijenin varlığını araştırmaya ihtiyaç duyduğunda genellikle elinde ya sadece parafin blok vardır ya da bir miktar formalinde fikse edilmiş doku bulunur . Bu nedenle parafin blok immünohistokimyası çok büyük imkanlar sağlamıştır²⁸ .

Immünohistokimyanın parafin blok kesitlerine uygulanabilmesi dokunun tesbitini takiben antijenik özelliklerin korunması ve bunlara spesifik antikorların bulunabilmesine bağlıdır. Fiksasyon işlemi mutlaka bir miktar antijen kaybına yol açar ancak geride genellikle tesbit edilebilecek kadar antijen kalır³⁴ .

Özellikle diferansiyasyonu kötü olan tümörlerin ayırıcı tanısında rutin histokimyasal yöntemler yetersiz kalabilir. Bu gibi durumlarda immünohistolojik çalışmaların yapılabilmesi patoloğa önemli imkanlar sağlamaktadır.

Histopatoloji literatürüne bakıldığında immünohistokimya üzerindeki çalışmaların diğer konulara göre Hodgkin-dışı lenfomalar üzerinde daha fazla olduğu görülür. Çünkü bu konudaki antikorlar diğerlerine göre çok fazla sayıdadır ve Hodgkin-dışı lenfoma konusunda hala araştırılması gereken çok nokta bulunmaktadır ²⁵.

Immünohistolojik çalışmalarla indifferansiye tümörler üzerinde küçük bir grup antikor paneli kullanarak rutin metodlarla ayırımında güçlük çekilen tümörleri hematolojik tümörler, karsinomlar, melanom ve sarkomlar olarak üç ana gruba ayırmak mümkündür ^{10,15,16}. Böyle bir sınıflama tedaviye yön verici olduğu gibi prognozu da gösterir. Zira iyi bir tedavinin en önemli ilk şartı doğru tanıdır.

Bu amaçla kullanılacak antikorlardan biri de "leucocyte common antigen" (LCA) adıyla bilinen lökositlere has bir antijene karşı hazırlanan monoklonal antikorlardır. LCA'ya karşı bilinen PD7/26 ve 2B11 antikorları Hodgkin dışı lenfomaların B ve T hücre tiplerinin çoğuyla reaksiyon verirler ^{10,39,47}. LCA antikorlarının duyarlılığı taze donmuş doku kesitlerine göre formalinle fikse parafinde bloklanmış dokularda daha az olsa da devam eder ⁴⁷.

Konvansiyonel yöntemlerle muhtemel karsinomlar, lenfomalar ve sınıflanamayan tümörler olarak üç gruba ayrılmış 120 vak'alık bir seride aralarında LCA'nın da bulunduğu bir grup antikor yardımıyla vak'aların sekizi dışında hepsi sınıflanmış ve önceki tanılarda değişiklikler olduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada ayırımında güçlük çekilen tümörler arasında lenfomaların başta geldiği görülmüş ve immünohistokimyasal çalışma sonucunda eğer bir tümörün tabiatı hakkında tereddüte düşülmüş ise bunun lenfoma olma ihtimalinin diğer tümörlere göre üç kat daha fazla olduğu bulunmuştur ¹⁶. Yani tanısında güçlük çekilen

tümörleri değerlendirirken akla ilk olarak gelmesi gereken tanılardan biri de Hodgkin-dışı lenfomalar olmalıdır.

Rutin işlem görmüş dokularda B ve T hücreleri, makrofajlar ve granüositleri tanıyan monoklonal antikorları elde etmek oldukça güçtür ¹¹. İmmünohistokimya çalışmalarında kullanılacak ve ticari olarak temini de mümkün olan çok sayıda antikor vardır. Ancak bunlar arasından en uygun olanlarının seçimi hem önemli, hem de oldukça güç bir problemdir. Antikor seçimine bir standart getirebilmek için de çalışmalar yapılmaktadır ¹⁷. Parafinde bloklanmış dokularda Hodgkin-dışı lenfomaların monoklonal ve poliklonal antikorlarla immünofenotiplenmeleri lenfoid hücrelerdeki antijenlerin çoğunun dehidrasyon, fiksasyon ve parafinde bloklama işlemleri sırasında denatürasyonu sebebiyle zor ve yetersiz olmaktadır ¹¹. Bu antijenik denatürasyon, gösterilebilecek antijenlerinin tamamına yakını dar bir sitoplazma nedeniyle membrana lokalize lenfoma hücrelerinde daha da zordur. Ancak günümüzde insan lökositlerindeki antijen moleküllerine karşı üretilen monoklonal antikorların pek çoğunun ticari olarak elde edilmesi artık mümkündür²⁵.

Lenfoid neoplazmaları diğerlerinden ayırdetmek için ortak lökosit antijeni CD45'e (leucocyte common antigen-LCA) karşı antikorların kullanımı yaygınlaşmıştır . Bu monoklonal antikor özellikle anaplastik tümörlerin ayırıcı tanısında yararlıdır ^{10,39}. LCA pozitif hücreler Hodgkin-dışı lenfomalar için oldukça karakteristiktirler ^{10,35,39,47}. Çalışmamızda LCA'nın Hodgkin-dışı lenfomalardaki hassasiyetini % 97 (33/34) kadar yüksek bir oranda bulduk. Bu da bize LCA'nın hematolojik tümörler için çok güvenilir bir antijen olduğunu göstermektedir. Boyanmanın spesifikliğı çok yüksek olduğundan histolojik ayrımı imkansız denecek kadar güç olan tümörler dahi LCA ile ayırdedilebilirler. Bunun en güzel

örneklerinden biri de hücreleri "lenfositlere benzeyen" olarak tarif edilen küçük ve dar sitoplazmalı hücrelerden meydana gelen küçük hücreli akciğer karsinomlarıdır. Küçük hücreli akciğer karsinomu tarafından tamamına yakın bir kısmı infiltrate edilmiş bir lenf bezinde normal lenfositlerle neoplastik hücreleri bir hematoksil-eozin kesitinde ayırdetmek mümkün değildir. Ancak LCA ile yapılan bir immünohistokimyasal boyama ile bu hücreler çok rahat bir şekilde ayırdedilebilirler (Resim 5)



Resim 5. Lenf bezi metastazı yapmış bir küçük hücreli akciğer karsinomu vak'asında lenfositlerle karsinom hücrelerinin LCA ile ayırdedilmesi. Soldaki lenfositler LCA ile pozitif reaksiyon verirken, sağdaki karsinom hücreleri sadece hematoksil-eozinle boyanmıştır. Renk farkı dışında hücrelerin histolojik yapılarının ayırdedilemediğine dikkat ediniz (Hematoksil-eozinle zıt boyanmış immünohistokimyasal metod x400)

Lenfoid neoplazmların hücre orijinine göre sınıflanmaları ilk defa Lukes ve Collins tarafından öne sürülmüştür⁶. Bundan sonra yapısal ve fonksiyonel analizler kullanılarak lenfomaların çoğunun T veya B hücre orijinli olduğu anlaşılmıştır^{6,24}.

Pek çok çalışmada parafin blok doku kesitlerinde anti B ve anti T hücre antikorlarının diyagnostik yararından bahsedilmekle birlikte en uygun antikor paneli tesbit edilememiştir. Ayrıca makalelerin çoğunda bahsedilen antikorlar henüz ticari olarak temini mümkün olmayan laboratuvarlarda özel çalışma ile elde edilmiş antikorlardır. Çalışmalarda kıyaslamayı mümkün hale getirmek için ticari olarak temin edilebilen antikorlar üzerinde de çalışmalar yapılmaktadır⁷.

B ve T hücrelerini parafin kesitlerde tanıyabilmek için pek çok monoklonal antikor tarif edilmiştir. Pan B antikorları olarak L26, L27, 4KB5, Leu 12, MB1, LN1, LN2, LN3, T015, MB1; pan T antikorları olarak UCHL1, LN1, LN2, LN3, Leu 1, Leu 4, Leu 5, Leu 9 ve BF1 gibi pek çok antikor kullanılmıştır^{6,7,10,11,21,31,33,39}. Tarif edilen ve halen birçoğu yaygın olarak kullanılan bu antikorlarla Hodgkin-dışı lenfomaların T ve B hücre serisine ait olduklarının söylenebilmesinde bazı güçlükler vardır. Hatalı sonuçlardan kaçınmak için mümkün olduğu kadar geniş bir antikor panelinin kullanımı tavsiye edilmektedir^{33,39}. Yapılan boyama sonucunda bir ya da birden fazla B antijeni gösteren antikorlar B lenfoma, bir veya daha fazla T antijeni bulunduranlar da T lenfoma olarak kabul edilirler³³.

Bizim çalışmamızda kullanılan 4KB5 antikoru da en çok kullanılan pan B antikorları arasındadır. 4KB5 germinal merkez ve mantle zon B hücreleri, bazı T hücre alt grupları ve monositlere karşı bir antikorudur^{7,10,11}. LCA'nın yüksek molekül ağırlıklı bir kısmı olan CD45R antijenini tanır. Taze doku ve hücre süspansiyonlarında periferik B hücreleri kadar T hücrelerinin bir kısmıyla

monositleri de işaretler. Ancak parafin blok kesitlerinde özellikle mantle zon B lenfositlerini gösterir. Bir diğer pan B antikoru olup CD20 antijenini tanıyan L27 ile birlikte kullanılırsa hassasiyetin % 94'e çıktığı bildirilmektedir^{7,11}.

Çalışmamızda T hücrelerini göstermek için UCHL 1 olarak bilinen monoklonal antikoru kullandık. UCHL1 T hücrelerini, B hücre alt gruplarının küçük bir kısmını, makrofaj ve granülositleri işaretler. LCA ailesinin düşük molekül ağırlıklı 180 kilodaltonluk bir şubasını tanıır^{2,10,11,31,35}. Parafin kesitlerde T hücrelerini kuvvetle işaretlerken diğer hücreleri hemen hiç göstermez. T hücre matürasyonunda daha geç dönemdeki hücreleri daha iyi işaretlemektedir¹¹.

Bu iki antikoru kullanarak Hodgkin-dışı lenfomaları tiplendirdiğimizde vak'alarımızın %70.6'sının B hücre serisinden, %14.7'sinin T hücre serisinden kaynaklandığını gördük. Kalan %14.7'lik vak'a arasında ise B ya da T hücre yönünde bir ayırım yapılamayacak kadar eşit miktarda antijenik boyanma görüldü.

Hodgkin dışı lenfomaların büyük çoğunluğu B hücre tipinde olduğunu bulduk. Bu konudaki diğer çalışmaların sonuçları da bizim bulgularımızla uyumludur^{1,23,42}. Taylor'ın 500 vak'adan daha fazla Hodgkin-dışı lenfomayı içine alan serisinde B lenfomaların %67, T lenfomaların da %20'lik yer tuttuğu, kalan %13'lük grubun ise sınıflandırılmadığı bildirilmektedir⁴². Bu konudaki diğer yazılarda da B lenfoma oranı %70 civarındadır²³. Gerçek histiyositik lenfomalar ise nadirdir^{5,23,24}.

Frozen kesitlerle tip tayini yapılmış vak'aların parafin blok kesitlerinde 61 vak'alık bir Hodgkin dışı lenfoma serisinde B lenfomaların %94'ünün, T lenfomaların tamamının L27, 4KB5 ve UCHL1 antikolarıyla doğru olarak tanınabildiği

yayınlanmıştır¹. Bir diğer çalışmada da B lenfomaların tamamının, T lenfomaların %93'ünün, Hodgkin hastalığı vak'alarının %86'sının, histiyositik neoplazmların da %80'inin olmak üzere lenfoid neoplazmların ortalama %95'inde monoklonal antikorlarla tiplendirmeye gidilebildiği bildirilmiştir².

Hodgkin-dışı lenfomaların B veya T hücre serisine ait olduklarını söylerken her zaman bir antijeni pozitif diğerini negatif bulmadık. Bazı vak'alarda her iki antikorla da pozitif boyanma elde edilirken bir antikorun diğerine göre daha fazla reaksiyon verdiğini tesbit ettik. Bu gibi vak'aları daha yoğun boyanma gösteren antikor lehine değerlendirdik. Bu vak'alardaki iki yönlü boyanma neoplastik hücreler arasındaki reaktif hücrelerden kaynaklanabileceği gibi antikorların birbirleriyle çapraz reaksiyon vermelerinin bir sonucu da olabilir. 4KB5 ve UCHL1 ile yapılan bir çalışmada B hücre neoplazmlarının %79'unun 4KB5 ile, %2'sinin de UCHL1 ile boyandığı gösterilmiştir. Aynı durum tersi için de söz konusudur ve T hücre neoplazmlarının %78'inde UCHL1 pozitif iken %14 vak'ada 4KB5'in de pozitif olduğu bulunmuştur. 4KB5 ve UCHL1 antikorlarının duyarlılıkları yüksek ancak spesifiteleri tam değildir⁷.

Hodgkin dışı lenfomaların her zaman B veya T hücre serilerinden birine ait olduklarının söylenemeyişinin bir diğer sebebi de bu lenfomalardan önemli bir kısmının heterojen yapıda oluşlarıdır. Yani bir lenfomada hem B hem de T hücre serisine ait neoplastik hücreler de bulunabilmektedir. Bu durum vak'alarımızın önemli bir kısmındaki iki yönlü boyanmaların varlığıyla kendini gösterdi. Özellikle küçük lenfositik, büyük hücreli, immünoblastik ve lenfoblastik lenfoma vak'alarında B ve T hücre serisi ayrımının daha iyi yapılabildiğini izledik. 564 vak'alık geniş bir seri üzerinde yapılan bir çalışmada ise küçük lenfositik ve diffüz mikst lenfomaların daha heterojen bir yapıya sahip oldukları, folliküler lenfomaların hemen daima B

hücre serisinden geliştikleri, immünoblastik lenfomaların da T veya B hücre serisinde ve homojen bir yapıda oldukları görülmüştür ^{1,44}. Bu bulgular da küçük lenfositik lenfomalar dışında bizim sonuçlarımızla uyumlu bulundu.

Immüoglobulinlere karşı yaptığımız boyamalarda belirgin zemin boyanması dikkat çekiciydi. Bunun en önemli sebebinin tesbit şartları olduğunu düşünmüyoruz. Çünkü antijen tesbitinde hızlı fiksasyon önemlidir ^{12,34,40}. Bazı antijenler çabucak ekstrasetüller ortama diffüze olurlar ³⁴. Taze donmuş kesitlerde immüoglobulin taşıdığı tesbit edilen hücrelerin parafin blok kesitlerinde sonuçların farklı oranlarda değiştiği görülmüştür ¹². Tesbitin hem süresi hem de kullanılan tesbit materyalinin cinsi immüoglobulinleri çok etkilemektedir. Fiksatifler antijenler üzerinde ve özellikle immüoglobulinler üzerinde tahrip edici etki göstermektedirler^{12,40}. Eskimiş ve tamponsuz formalin asidik özellikte olup özellikle immüoglobulinler için tahrip edicidir ⁴⁰. B lenfomaların büyük çoğunluğunda immüoglobulinleri pozitif bulurken bazı B lenfomalarda immüoglobulin tesbit edemedik veya oldukça zayıf bir reaksiyon elde ettik. Burada tesbit işleminden öte göz önüne alınması gereken bir nokta daha vardır. Plazma hücrelerindeki immüoglobulin çok bol olduğundan kolayca gösterilebilirken B hücre lenfomalarında hücreler büyük olsa dahi sitoplazmik immüoglobulin iyi bir şekilde gösterilemeyebilir . Çünkü bu hücrelerin immüoglobulin miktarı plazma hücrelerine göre çok az miktardadır ve fiksasyondan sonra bu fark belirgin olarak artar. Immüoglobulinler için B5 fiksatifinin , daha iyi sonuçlar verdiğine dair yayınlar vardır ^{34,40}. Kullanılan antikorum optimum reaktivitesi fiksatife bağımlı olabilir . Ancak bütün antijenler için çok iyi sonuç veren ortak bir fiksatif olduğu söylenemez ¹⁰.

Kullanılan fiksatifin uygulama süresi de çok önemlidir . Lenfomalar üzerinde yapılan bir çalışmada tesbit süresine bağlı olarak hassasiyetin % 55.6 ile % 94.7

arasında değiştiği görülmüştür ³⁰.

Bütün avantajlarına rağmen Hodgkin-dışı lenfoma patolojisinde immnohistokimyanın konvansiyonel yöntemlere üstün olduğunu söylemek mümkün değildir. nkt kullandığımız antikörlerin hemen tamamı neoplastik hücreleri olduğu kadar benign hücreleri de göstermektedir. Benign veya malign olduğu konusunda bir karara varılamayan vak'alarda immnohistokimyanın yardımı henüz sınırlıdır.

şimdilik lenfoma patolojisinde üzerinde en çok durulan konular morfolojik sınıflamalarla bunlara uyan immünohistokimyasal antijen profillerinin çıkarılması ve değişik lenfoid malignitelerin orijin aldıkları hücrelerin ortaya konmasıdır ²⁵.

Morfoloji ile fenotipin karşılaştırılması konusunda yapılan bir çalışma ilk bakışta -farklı lenfomaların antijenik profillerinin ortaya çıkarılmasını sağlayacağından- çok faydalı gibi görülür. Monoklonal antikörlerin kullanımıyla morfolojik sınıflamaların yerini alacak bir immnfenotipik sınıflamanın radikal bir çözüm getireceğine dair umutlar da vardır. Bütün morfolojik kategorilerdeki tümörlerin antijenik profilleri bulunarak bir cetvel haline getirilebilir. Böylece patoloğların bugüne kadar farklı lenfoma tiplerinin morfolojik ayrıntılarını öğrenmek için yaptıkları yorucu çalışmalar da gereksiz hale gelebilecektir ²⁵.

Fenotip ile klinik davranış arasında bağıntı kurmak ise daha zordur. Bugün için immünolojik markerlar büyüme hızı gibi dinamik özellikleri ortaya koymada yararlı olabilmektedirler . Mesela T9 antijeninin büyümeye eşlik eden bir marker olduğu, iyi diferansiye lenfositik lenfomalarda proliferasyon merkezlerinde sayılarının arttağı gösterilmiştir ^{25,27}.

Bütün insan lenfoması hücrelerinin normalde bir karşılıkları olduğu ve bunların matürasyon siklusunda bir yere uyduğu geniş kabul gören bir fikirdir . Ancak pratikte devamlı olarak yeni antijenlere karşı antikorların üretilmesi sonucunda neoplastik hücrelerin normaldeki karşılıklarından oldukça farklı oldukları anlaşılmaya başlamıştır . Fakat herşeye rağmen gene de neoplastik hücre orijin aldığı normaldeki hücreye ait pek çok antijeni taşımaya devam eder ²⁵. Bu özellik de bize Hodgkin-dışı lenfomaların B veya T hücre serisine ait olduklarını söyleyebilme imkanını tanır.

Lenfoma hücrelerinin geliştikleri hücrelere ait pek çok antijen yanında kendilerini benign hücrelerden ayırdetmeye yarayacak normalden farklı antijenleri de vardır. Bu fenotipik farklılıklara karşı yeni antikorlar bulunmakta ve böylece malign lenfoproliferasyonların tanısı giderek kolaylaşmaktadır. Bu fenotipik farkların bir kısmı Hodgkin dışı lenfomanın klonal bir neoplazm oluşundan kaynaklanmaktadır . Klonal bir neoplazm deyimi tek ya da az sayıda hücre klonunun neoplastik proliferasyonunu yansıtır . Oysa normal ya da reaktif popülasyonlar çok sayıda klondan meydana gelirler ³³.

Son yıllardaki hızlı immünolojik gelişmeler patolojlara benign ve malign lenfoproliferasyonlar arasındaki farkları tesbit etme imkanını da vermeye başlamıştır. Histolojik olarak benign ve malign oldukları ayırdedilmiş geniş bir seri lenfoproliferatif olay üzerinde yapılan çalışmada benign ve malign lenfoproliferasyonların immünohistolojik olarak ayırdedilmesini sağlayan bazı fenotipik özellikler ortaya konmuştur. Genel olarak normal antijenlerin kaybı ya da anormal antijenlerin ortaya çıkması şeklinde özetlenebilecek bu özellikler B ve T lenfomalar için ayrı ayrı tarif edilmeye çalışılmıştır ³³.

Lenfoma tanısındaki immünofenotipik kriterler monoklonaliteyi gösterenler ve anormal antijen ekspresyonu gösterenler olarak başlıca iki ana grupta incelenebilir. Normalde bulunmayan bir antijenin ortaya çıkması, normal olarak bulunması gereken bir antijenin kaybı veya tek tek bulunması gereken antijenlerin aynı hücrede birlikte görülmeleri anormal antijen ekspresyonu başlığı altında toplanırlar. Ortaya çıkarılan yeni bir anormal immünofenotipik kriterin bütün lenfoma hücrelerinde olması gerekmez ancak benign lenfoproliferasyonların hiçbirinde görülmemeleri esastır³³.

B lenfomalarda malign immünofenotipik kriterler :

B lenfomalarda belirlenmiş bazı malign immünofenotipik kriterler vardır. Bunlardan immünooglobulin hafif zincirinin tek tip oluşu gibi monoklonaliteyi gösteren özellikler uzun zamandır bilinmekteyken tarif edilmiş daha yeni immünofenotipik kriterler de vardır³³(Tablo VII).

Tablo VII. Hodgkin-dışı B lenfomaların malign immünofenotipik özellikleri
A. Klonalite bulguları (Ig hafif zincir tek tipliliği)
B. "Anormal" antijenlerin ortaya çıkışı
1. Hafif zincir negatif B hücre serisi
2. Leu 1+ B hücre serisi
3. L 60 + B hücre serisi
4. 41 H + proliferen olan B hücre serisi
5. Pan B antijenlerinin kaybı
6. LFA 1 - B hücre serisi

Immünooglobulin hafif zinciri: Immünooglobulinlerde ağır zincirlerden başka kappa ve lambda adlı iki de hafif zincir bulunur. Normalde bir immünooglobulin molekülüne adını veren ağır zincirlerden biridir. Immünooglobulin genleri ile ağır ve hafif zincirlerin değişik kombinasyonlarıyla 10⁷'den fazla çeşitliliğe sahip antikör

elde edilebilir. Bir B hücrelerinde muhtemel 10^7 DNA diziliminden sadece birinin görülmesi nedeniyle monoklonal (neoplastik) ve poliklonal (reaktif) hücre proliferasyonlarının ayırdedilmesi mümkündür. Benign B hücre proliferasyonlarındaki immüoglobulinlerin hem kappa hem de lambda hafif zincirlere sahip olmalarına karşılık neoplastik popülasyonlardaki immüoglobulinlerin tek tip yani monoklonal immüoglobulinleri bulunur. Immüoglobulin monoklonalitesinin olduğunu söyleyebilmek için bir hafif zincirin diğerine en az % 90 oranda hakim olması gerekir. Ancak teorik olarak çok basit olan bu ayırımın pratik uygulamada bazı güçlükleri de vardır. Ancak bütün zorluklarına rağmen monoklonal immüoglobulin varlığının tesbiti en faydalı B lenfoma teşhis prosedürüdür^{9,33}.

Tabloda görülen diğer malign immünofenotipik özellikler henüz yeni tarif edilmişlerdir. Bu antijenlerin bir kısmı normalde T hücrelerine ait oldukları için anormal olarak kabul edilirken bazıları da doğrudan doğruya B hücrelerine ait malign immünofenotipik özellikler olarak öne sürülmüştür³³.

T lenfomalarda malign immünofenotipik kriterler:

T lenfomalar için kullanılabilecek immünofenotipik kriterler ise hem sayıca daha azdır hem de aralarında B lenfomalardaki immüoglobulin monoklonalitesi gibi yaygın kullanım alanı bulmuş bir özellik henüz yoktur. T lenfomalar için tarif edilen immünofenotipik özellikler de B lenfomalardakiler gibi iki ana grupta toplanmıştır³³ (Tablo VIII).

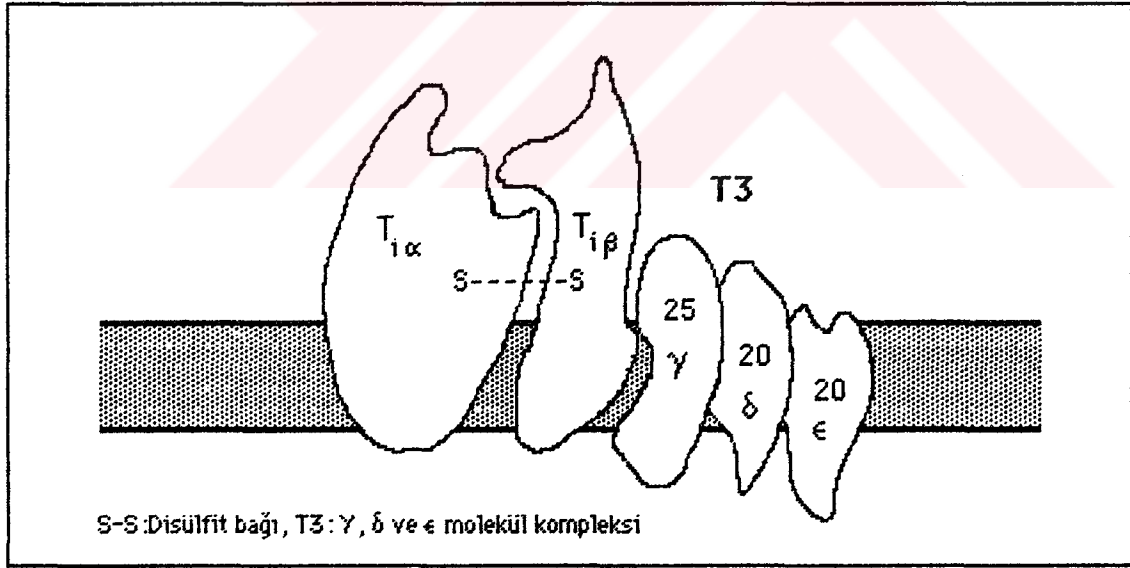
Tablo VIII. Hodgkin - dışı T lenfomaların malign immünofenotipik özellikleri

A. Klonalite bulguları (TCR değişken bölge antikorları)*
B. "Anormal" antijen ortaya çıkışı **
1. Pan T antijenlerinin kaybı
2. T altgrup antijenlerinin kaybıya da birlikte ortaya çıkışı
3. Leu 6 + T hücre serisi
4. MB 1+ T hücre serisi

* Teorik olarak mümkün, henüz bulunmuş antikor yok

** Timus hariç

T hücre neoplazmlarının monoklonalitesinin tayini için T hücre reseptörüne (TCR) ait değişken bölgeye karşı antikorların üretilmesi çalışmaları umut vericidir²⁹. Yakın zamanlara kadar TCR'nin ne olduğu bilinmiyordu. Ancak moleküler biyolojideki ilerlemelerle bunun ayrıntılarıyla öğrenilmesi mümkün olmuştur (Şekil 9)^{9,36}.



Şekil 9. İnsan T hücre reseptörünün şematik yapısı. T_iα ve T_iβ subünitleri disülfid bağlarıyla bağlıdır. Sayılar kilodalton olarak molekül ağırlıklarını göstermektedir.

T hücrelerindeki TCR'lerin herbiri, bir değişken (yani antijen bağlayan) ve bir sabit bölge olmak üzere iki bölge ihtiva eden birer heterodimerdir. Şimdiye kadar tesbiti yapılamayan T hücre proliferasyonlarının klonalite tayini için ya TCR gen

rearanjmanları yapılacak ya da antiklonotipik antikorlar kullanılması gerekecektir^{9,38}.

T hücrelerine ait maligniteyi gösterdiği öne sürülen diğer immünofenotipik özellikler ise ya immatür T hücrelerine ait özellikler ya da matür hücrelerde sadece biri bulunması gereken antijenik özelliklerin birlikte ortaya çıkmaları gibi özelliklerdir³³.

Bu kriterlerle yaklaşık 500 vak'a üzerinde B hücre malignitelerinin % 90'dan fazlasında, T hücre malignitelerinin de yaklaşık % 80'inde benign ve malign proliferasyonların ayırdedilebildiği bildirilmiştir³³.

Immünohistokimyada hala çözüm bekleyen pek çok sorun vardır . Bir antikorun "zor" vak'alarda muhtemel tanılar arasında ayırım yapabileceğinden kesin olarak emin olunamaz . Lenfomalarda EMA, düz kas tümörlerde sitokeratin gibi beklenmedik çapraz reaksiyonlara dair yayınlar pek rağbet görmemekte zor kabul görmektedir^{17,42}. Immünohistokimyasal sonuçlar ve International Working Formulation arasında entegrasyon çalışmaları yapılmıştır⁴⁴. Giderek lenfomaların immünfenotiplendirilmesi yaygınlaşmaktadır ancak klinik zeminde hastalara nasıl daha farklı yaklaşılacağı konusu henüz iyi bilinmemektedir . Bu gibi sorunların çözümü zamana ve dikkatli takibe muhtaçtır.

SONUÇ

1.İmmünohistokimyasal metodlar uygulaması kolay, hassasiyeti yüksek, kullanım alanı geniş yöntemlerdir.

2.Lenfositler üzerinde tarif edilen çok sayıda antijen ve bunlara karşı üretilmiş antikorlar bulunduğundan Hodgkin-dışı lenfomalar immünohistokimya metodlarının en geniş ve yaygın kullanım alanları arasında yer alır.

3.Halen Hodgkin-dışı lenfomalarda konvansiyonel histopatolojik yöntemlerin değeri sürmektedir.

4.Lenfoma sınıflamalarındaki "çokseslilik" nedeniyle sınıflamada International Working Formulation'ın kullanımı daha yararlıdır. Ancak giderek artan oranda yeni antijenlerin tarif edilmesi nedeniyle Hodgkin-dışı lenfomalarda hem immünolojik, hem de morfolojik bir sınıflamaya doğru bir gidiş başlamıştır.

5.Diferansiasyonu kötü tümörler arasında ilk olarak akla gelmesi gereken neoplazmlardan biri de Hodgkin-dışı lenfomadır.

6.Hodgkin-dışı lenfoma vak'alarımızda LCA'nın pozitiflik oranı % 97 bulundu. İndiferansiye tümörler arasında ayırım yapmada LCA'ya karşı monoklonal antikorların kullanımı önemli ölçüde yol göstericidir.

7.Vak'alarımızın % 70.6'sı B hücre, %14.7'si ise T hücre orijinli olduğunu bulduk. Hodgkin-dışı lenfomaların çok büyük bir kısmı B veya T hücre tipindedir. Bu tümörlerin kaynaklandıkları hücre tipinin immünohistokimyasal olarak monoklonal antikolarla gösterilmesi mümkündür.

8.Hodgkin-dışı lenfomaların %14.7'sinde B veya T hücre ayırımına gidilemedi. Bazı lenfomalarda B veya T hücre ayırımı yapılamaz. Bu kullanılan antikoların spesifitesi, neoplazm içinde reaktif hücrelerin bulunabilmesi ya da tümörün kendisinin heterojen yapıda olmasından kaynaklanan bir durumdur.

9.Immüoglobulin boyamalarında % 57.84 oranında zemin boyanması izledik. Immüoglobulinler rutin tesbit ve takip işlemlerine çok hassastır. Bu nedenle immüoglobulinler üzerinde yapılan immünohistolojik çalışmalarda başarı oranı daha düşüktür. Ortaya çıkan zemin boyanması değerlendirmeyi büyük oranda güçleştirir.

10.Monoklonal antikolarda düşük orandaki (%1.96) zemin boyanmasının poliklonal antikolarda çok yüksek (% 57.84) olduğunu gördük. Mümkün olduğu zaman monoklonal antikoların tercihi başarıyı artırmaktadır.

11.Lenfoma immünohistokimyasındaki en önemli problemlerden biri günümüzde kullanılan antikoların benign ve malign hücreler arasında bir ayırım yapamayışlarıdır. Fakat son zamanlarda maligniteyi gösteren antijenlere karşı antikolar da elde edilmektedir.

ÖZET

Hodgkin-dışı lenfomaların tanı ve tiplendirmesi diyagnostik patolojinin en zor konularından biridir. Hodgkin-dışı lenfoma tanısında son onbeş yıl içindeki immünohistolojik çalışmalar heyecan verici yeni bir boyut getirmiştir.

Hodgkin-dışı lenfomaların kaynaklandığı hücre serisini tayin etmek için immünohistolojik bir çalışma yaptık. 34 Hodgkin-dışı lenfoma vak'asından hazırlanan parafin kesitlerin hücre orijini üç monoklonal, üç poliklonal antikordan oluşan bir antikor paneliyle araştırıldı. Kullanılan antikor paneli anti-ortak lökosit antijeni (LCA), anti B hücre antijeni (4KB5), anti T hücre antijeni (UCHL1) ve immünooglobulin G, A, ve M ye karşı antikorlardan meydana geliyordu. Çalışmada immünolojik boyanma için avidin-biotin peroksidaz kompleks metodu kullanıldı.

LCA antikorunun Hodgkin-dışı lenfomaların tanınmasında büyük yardımı olduğu görüldü. Biri dışında bütün vak'alarımız anti-LCA ile reaksiyon verdi (% 97, 33/34). Lenfoma vak'alarının % 70.6'sının B hücre serisi, % 14.7'sinin de T hücre serisi kaynaklı olduğu izlendi.

Özetle, LCA antikoru Hodgkin-dışı lenfomalar için yüksek derecede hassas ve spesifiktir. 4KB5 ve UCHL1 antikorları Hodgkin-dışı lenfomaları B ve T lenfomalar şeklinde sınıflamak için yararlı bir ikili oluşturur ancak bu antikorlar tam olarak duyarlı ve spesifik değildirler.

Anahtar kelimeler : Hodgkin-dışı lenfomalar, immünohistokimya, LCA, 4KB5, UCHL1.

SUMMARY

The diagnosis and phenotyping of non-Hodgkin's lymphomas is one of the most difficult problems in surgical pathology. During the last fifteen years immunohistochemical techniques have added an new exciting dimension especially to the diagnosis of non-Hodgkin's lymphomas.

To determine cell lineage of non-Hodgkin's lymphomas we performed an immunohistochemical study. The cell lineages of paraffin sections prepared from 34 non-Hodgkin's lymphomas was investigated with a panel of three monoclonal and three polyclonal antibodies. The antibody panel was used including anti-leucocyte common antigen (LCA), anti-B cell antigen (4KB5), anti-T cell antigen (UCHL1), anti-immunoglobulins G, A and M. The avidin-biotin peroksidase complex technique was used for immunostaining in this study.

LCA antibody has made a significant contribution to the immunohistochemical definition of non-Hodgkin's lymphomas. All of our cases reacted with anti-LCA, except one (97%, 33/34). 70.6 percent of the non-Hodgkin's lymphomas were B lineage and 14.7 percent were T lineage.

In summary, LCA antibody has a high sensitivity for the non-Hodgkin lymphomas and 4KB5 and UCHL1 form a useful but not absolutely spesific or sensitive paraffin section immunohistochemical panel for the categorization of B and T cell non-Hodgkin's lymphomas.

Key words : Non-Hodgkin's lymphoma, immunohistochemistry, LCA, 4KB5, UCHL1.

KAYNAKLAR

1.Aisenberg A.C., Wilkes B.M., Harris N.L.: Monoclonal antibody studies in non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 61: 469-475, 1983.

2.Andrade R.E., Wick M.R., Frizzera G.,et al.: Immunophenotyping of hematopoietic malignancies in paraffin sections. *Hum Pathol* 19: 394-402, 1988.

3.Bennett M.H., Farrer-Brown G., Henry C.,et al.: Classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Lancet* 2: 405-406, 1974.

4.Bindl J.M., Warnke R.A.: Advantages of detecting monoclonal antibody binding to tissue with biotin and avidin reagents in Coplin jars. *Am J Clin Pathol* 85: 490-493, 1986.

5.Burns B.F., Dardick I: Ki-1 positive non-Hodgkin's lymphomas.: *Am J Clin Pathol* 93: 327-332, 1990.

6.Cartun R.W., Coles F.B., Pastuszak W.T.: Utilization of monoclonal antibody L26 in the identification and confirmation of B-cell lymphomas. *Am J Pathol* 129: 415-421, 1987.

7.Clark J.R., Williams M.E., Swerdlow S.H.: Detection of B- and T-cells in paraffin-embedded tissue sections. *Am J Clin Pathol* 93: 58-69, 1990.

8.Collins R.D., Waldron J.A., Glick A.D.: Results of multiparameter studies of T-cell lymphoid neoplasms. *Am J Clin Pathol* 72: 699-707, 1979.

9. Cotran S., Kumar V., Robbins S.L.: *Robbins' Pathologic Basis of Disease*. W.B. Saunders Company, Philadelphia 1989, pp.165-167.
10. Davey F.R., Elghetany M.T., Kurec A.S.: Immunophenotyping of hematologic neoplasms in paraffin-embedded tissue sections. *Am J Clin Pathol* 93(Suppl 1): S17-S26, 1990.
11. Davey F.R., Gatter K.C., Ralfkiaker E., et al.: Immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphomas using a panel of antibodies on paraffin-embedded tissues. *Am J Pathol* 129: 54-63, 1987.
12. DeLellis R.A., Sernberger L.A., Mann R.B., et al.: Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. *Am J Clin Pathol* 71: 483-488, 1979.
13. Dorfman R.F.: Classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 2: 961-962, 1974.
14. Falini B., Taylor C.R.: New developments in immunoperoxidase techniques and their application. *Arch Pathol Lab Med* 107: 105-117, 1983.
15. Gatter K.C., Alcock C., Heryet A., et al.: The differential diagnosis of routinely processed anaplastic tumors using monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol* 82: 33-43, 1984.
16. Gatter K.C., Alcock C., Heryet A., et al.: Clinical importance of analysing malignant tumors of uncertain origin with immunohistological techniques. *Lancet* 1: 1302-1305, 1985.
17. Gatter K.C., Mason D.Y., Heyderman E., et al.: Which antibodies for diagnostic pathology? *Histopathology* 11: 661-664, 1987.
18. Hsu S., Raine L., Fanger H.: A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 75: 734-738, 1981.

19.Hsu S., Raine L., Fanger H.: The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* 75: 816-821, 1981.

20.Lennert K. :*Histopathology of non-Hodgkin Lymphomas*. Springer-Verlag, Berlin, 1981.

21.Linder J., Ye Y., Harrington D.S., et al.: Monoclonal antibodies marking T lymphocytes in paraffin-embedded tissue. *Am J Pathol* 127: 1-8, 1987.

22.Lukes R.J.:The immunologic approach to the pathology of malignant lymphomas. *Am J Clin Pathol* 72: 657-669,1979.

23.Lukes R.J., Collins R.D.: Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 34: 1488-1503, 1974.

24.Lukes R.J., Taylor C.R., Parker J.W., et al.: A morphologic and immunologic surface marker study of 299 cases of non-Hodgkin lymphomas and related leukemias. *Am J Pathol* 90: 461-486, 1978.

25.Mason D.Y.: A new look at lymphoma immunohistology. *Am J Pathol* 128:1-4, 1987.

26.Mathe G., Rappaport H., O'Connor T., et al.: Histological and cytological typing of neoplastic diseases of hematopoietic and lymphoid tissues. In *WHO International Classification of Tumours* No.14. Geneva, World Health Organization, 1976.

27.Medeiros L.J., Strickler J.G., Picker L.J., et al.: "Well- differentiated" lymphocytic lymphomas. *Am J Pathol* 129: 523-535, 1987.

28.Mesa-Tejada R., Pascal R.R., Fenoglio C.M.: Immunoperoxidase: A sensitive immunohistochemical technique as a "special stain" in the diagnostic pathology laboratory. *Hum Pathol* 8: 313-319, 1977.

29.Mori N.,Kuniyuki O., Yoda Y., et al.: T-cell receptor expression in the T-cell malignancies. *Am J Clin Pathol* 93: 495-501, 1990.

30. Ng C.S., Chan J.K.C., Hui P.K., et al.: Monoclonal antibodies reactive with normal and neoplastic T cells in paraffin sections. *Hum Pathol* 19: 295-303, 1988.

31. Norton A.J., Ramsay A.D., Smith S.H., et al.: Monoclonal antibody (UCHL1) that recognizes normal and neoplastic T cells in routinely fixed tissues. *J Clin Pathol* 39: 399-405, 1986.

32. Parker J.W.: Immunologic basis for the redefinition of malignant lymphomas. *Am J Clin Pathol* 72: 670-686, 1979.

33. Picker L.J., Weiss L.M., Medeiros L.J., et al.: Immunophenotypic criteria for the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 128:181-201, 1987.

34. Pinkus G.S.: Diagnostic immunocytochemistry of paraffin-embedded tissues. *Hum Pathol* 13: 411-415, 1982.

35. Pizzolo G., Sloane J., Beverley P., et al.: Differential diagnosis of malignant lymphoma and non-lymphoid tumors using monoclonal anti-leucocyte antibody. *Cancer* 46: 2640-2647, 1980.

36. Rappaport H.: Tumors of the hematopoietic system. *Atlas of Tumor Pathology*; Section 3, Fascicle 8. Washington D.C., US Armed Forces Institute of Pathology, 1966.

37. Rosai J.: *Ackerman's Surgical Pathology*. The C.V. Mosby Company, St. Louis 1989, pp 1312-1337.

38. Royer H.D., Reinherz E.L.: T lymphocytes: Ontogeny, function, and relevance to clinical disorders. *N Engl J Med* 317: 1136-1142, 1987.

39. Strickler J.G., Weiss L.M., Copenhaver C.M., et al.: Monoclonal antibodies reactive in routinely processed tissue sections of malignant lymphoma, with emphasis on T-cell lymphomas. *Hum Pathol* 18: 808-814, 1987.

40. Taylor C.R.: Immunoperoxidase techniques. *Arch Pathol Lab Med* 102: 113-121, 1978.

41. Taylor C.R.: Classification of lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 102: 549-554, 1978.
42. Taylor C.R.: Results of multiparameter studies of B-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol* 72:687-698, 1979.
43. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project: National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer* 49: 2112-2135, 1982.
44. Tubbs R.R., Fishleder A., Weiss R.A., et al.: Immunohistologic cellular phenotypes of lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol* 113: 207-221, 1983.
45. Tubbs R.R., Shebani K., Sebek B.A.: Immunohistochemistry versus immunofluorescence for non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Clin Pathol* 73: 144-145, 1980.
46. Tweel J.G., Lukes R.J., Taylor C.R.: Pathophysiology of lymphocyte transformation. *Am J Clin Pathol* 71: 509-520, 1979.
47. Warnke R., Gatter K.C., Falini B., et al.: Diagnosis of human lymphoma with monoclonal antileukocyte antibodies. *N Engl J Med* 309: 1275-1281, 1983.
48. Warnke R., Pederson M., Williams C., et al.: A study of lymphoproliferative diseases comparing immunofluorescence with immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 70: 867-875, 1987.
49. Wheather P.R., Burkitt H.G., Daniels V.G.: Immune system. In *Functional Histology*, Churchill Livingstone, Edinburgh, pp 162, 1987.
