

1814

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ  
TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI

AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİDE MONOKLONAL  
ANTİKORLARLA FENOTİPİK ÖZELLİKLERİN VE  
T-LENFOTROPİK VIRUS ANTİKORLARININ  
İNCELENMESİ

Tümör İmmünolojisi ve Biyolojisi Bilim Dalı

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Biol. HAYAT ERDEM

Rehber Öğretim Üyesi : Doç.Dr. EMİN KANSU

ANKARA – 1987

T. C.  
Yükseköğretim Kurulu  
Değerlendirme Merkezi

## İ Ç İ N D E K İ L E R

|                           | <u>Sayfa No.</u> |
|---------------------------|------------------|
| GİRİŞ ve AMAÇ.....        | 1                |
| GENEL BİLGİLER.....       | 3                |
| MATERYAL ve METODLAR..... | 36               |
| BULGULAR.....             | 48               |
| TARTIŞMA.....             | 56               |
| ÖZET.....                 | 65               |
| KAYNAKLAR.....            | 67               |

## GİRİŞ ve AMAÇ

Normal ve malign neoplastik lenfositlerin hücre yüzey özelliklerinin tanınması, lenfoproliferatif hastalıkların immünolojik fenotipini ve hücre kaynağını belirlemede önem taşımaktadır. Son yıllarda geliştirilen çok duyarlı ve özgül monoklonal antikörlerle yapılan incelemeler bu hastalıkların tanı patogenezi tedavi ve prognozları yönünden büyük yararlar sağlamaktadır<sup>(1)</sup>.

İnsan T-hücre lösemi/lenfoma virusu (HTLV) ailesinin bulunması, lenfoid ve diğer bazı tip neoplazmların etyopatogenezi için yeni bir yaklaşım getirmiş ve RNA tipi viruslar ile neoplastik hücre gelişimi ilişkisini araştıran çalışmalar son yıllarda hızla artış göstermiştir<sup>(2,3)</sup>.

T-lenfositlerine karşı tropizm gösteren HTLV-I ve HTLV-II retroviruslarının "T-tipi ALL" ve "Hairy Cell Leukemia" hastalarının serumlarında araştırılmasıyla değişik lenfoid malignansilerin etiyolojisinin anlaşılması ve endemik yayılma gösteren bu virusun yeryüzündeki dağılımının ortaya çıkarılması sağlanabilmektedir<sup>(4,5)</sup>. Günümüzde lenfosit yüzey belirleyicilerini tanıyan monoklonal antikörlerin kullanılmasıyla ALL tanısı alan hastalarda hücre fenotipi/altgrupları çok daha duyarlı ve güvenilir bir şekilde belirlenmekte, altgrupların sınıflandırılması daha kolaylıkla yapılabilmektedir<sup>(6,7)</sup>.

Bu alışma, Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Hematoloji ve Erişkin Onkoloji nitelerinde takip edilmekte olan ALL hastalarının altgruplarını saptamak üzere lenfosit yüzey işaretlerinin monoklonal antikoklarla belirlenmesi, ALL altgruplarının sınıflandırılması ve bu hastalarda retroviruslardan HTLV-I ve HTLV-III viruslarına karşı antikokların varlığının araştırılması amacıyla Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.



## GENEL BİLGİLER

### LENFOİD SİSTEM

İmmün sistem, mikroorganizmalar ve transforme hücreler gibi eksojen ve endojen faktörlere karşı konağın yabancıyı tanıma ve ayırdetme özellikleri ile oluşan savunma mekanizmalarını içeren karmaşık bir sistemdir <sup>(8)</sup>. İmmün cevap oluşturan antijen konağa deri ve mukozadan emilimle, solunum, sindirim veya plesental yollarla girebilmektedir. İmmün cevabın oluşabilmesi için antijenin konak immün hücreleri tarafından tanınması gerekmektedir <sup>(9)</sup>.

İmmünojeni tanıyarak elimine eden hücreler, lenfosit adı verilen küçük beyaz küreler ve fagositik monosit/makrofajlar olmak üzere iki ana grupta toplanmaktadır. Kan dolaşımındaki monositler ve doku histiyositleri, fagositik monosit/makrofaj sistemini oluşturmakta ve immün cevapta çok değişik görevler almaktadırlar. Her farklı antijen için özel makrofaj olmadığı bilinmekle beraber, antijenleri lenfositlere sundukları, T ve B-lenfositleri üzerinde etkili olan bazı aracı maddeleri sentezleyerek salgıladıkları gösterilmiştir <sup>(8)</sup>.

Diğer kan hücreleri gibi kemik iliğindeki stem hücrelerden kaynaklanan lenfositler, T ve B-lenfositleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Stem hücreden geliştikten sonra, timik hormonlar etkisi ile timusta olgunlaşarak hücrel immün sistemi oluşturan T-lenfositleri bütün periferik kan

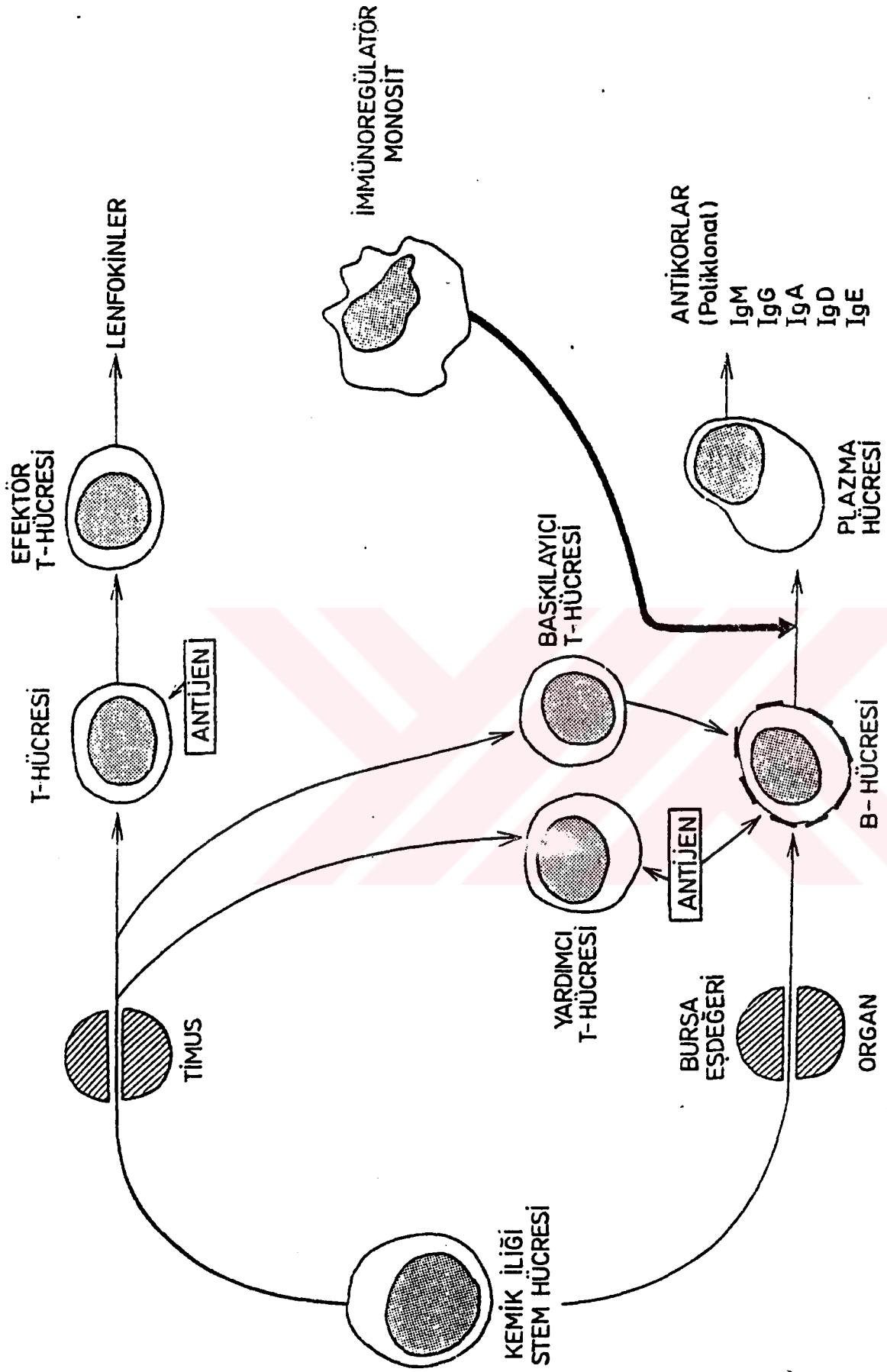
lenfositlerinin % 80-90 kadarını teşkil etmektedirler. Stem hücreden geliştikten sonra kuşlarda Bursa of Fabricius'ta, insanda ise Bursa eşdeğeri olan kemik iliğinde olgunlaşarak, antikor sentezleme yolu ile hümorale immün sistemi oluşturan B-lenfositleri, bütün periferik kan lenfositlerinin % 5-10 kadarını teşkil etmektedirler (10).

Birbirlerine son derece bağımlı olan bu iki hücre grubunun fonksiyonlarının oldukça farklı olduğu gösterilmiştir. Bir immünojene karşı oluşan immün cevap, T ve B-lenfositleri, monositler, MHC (Major Histocompatibility Complex) ürünleri arasındaki fiziksel ve mediatör aracılı etkileşim sonucu gerçekleşmektedir (9).

Şekil 1'de immünoregülatuar sistem gösterilmektedir.

T-lenfositleri :

Pre-natal dönemde 8. ve 9. haftalarda ilk lenfoid organ olan timusta gösterilen lenfositler, fetus karaciğeri gibi stem hücre oluşturan organlardan kaynaklanmaktadır. 12. ve 16. haftalarda fetus dalak ve lenf düğümünde de gösterilebilen lenfositler, 16-24. haftalar arasında T-lenfositlere özgül olan PHA (Phetohemagglutinin) ile uyarılma yeteneği kazanmaktadır (9).



ŞEKİL 1 : İmmüno-regülatuar Sistem

T-lenfositleri timusta farklılaşmaktadır. Kemik iliğinde meydana gelen stem hücreler, timik kortekse yerleştikten sonra timik stromanın indüklediği bir dizi farklılaşma basamağından geçerek, timusun medulla bölgesine kadar gelmektedir. Farklılaşma basamakları fonksiyonel yönden gösterilebilmelerinin yanı sıra, T-lenfosit yüzey antijenlerinin ifadelerinden yararlanılarak da belirlenebilmektedir<sup>(8)</sup>.

Tablo 1'de insan T-lenfosit farklılaşması ve fonksiyonlarının saptanmasında yararlı olan yüzey antijenleri gösterilmektedir.

| Antijen. | Moleküler Ağırlık          | MoAb                      | % Pozitif |                   | Özellikleri  |
|----------|----------------------------|---------------------------|-----------|-------------------|--|
|          |                            |                           | Timosit   | Periferik T-hücre |  |
| T11      | 55.000                     | OKT-11<br>Leu-5           | 95        | 100               | Koyun eritrositiyle rozet yapma ile ilgilidir                                      |
| T10      | 37.000                     | OKT-10                    | 95        | 5                 | Erken stem hücre, bazı B-lenfositleri, aktive periferik T-lenfositlerinde bulunur. |
| T9       | 190.000                    | OKT-9                     | 10        | 0                 | Transferrin reseptörü aktive T-hücrede bulunur                                     |
| T8       | 32.000<br>43.000           | OKT-8<br>Leu-2a<br>Leu-2b | 80        | 35                | Sitotoksik/Baskılayıcı T-hücrede bulunur   |
| T6       | 44.000                     | OKT-6<br>Leu-6            | 70        | 0                 | Fare TL antijeni eşdeğeridir.  |
| T4       | 60.000                     | OKT-4<br>Leu-3            | 75        | 65                | Yardımcı/İndükleyici T-hücrede bulunur   |
| T3       | 20.000<br>23.000<br>26.000 | OKT-3<br>Leu-4            | 20        | 100               | Antijen için T-hücre reseptörü ile ilgilidir                                       |
| T1       | 67.000                     | OKT-1<br>Leu-1            | 95        | 100               | Fare Thyl antijeni eşdeğeridir   |

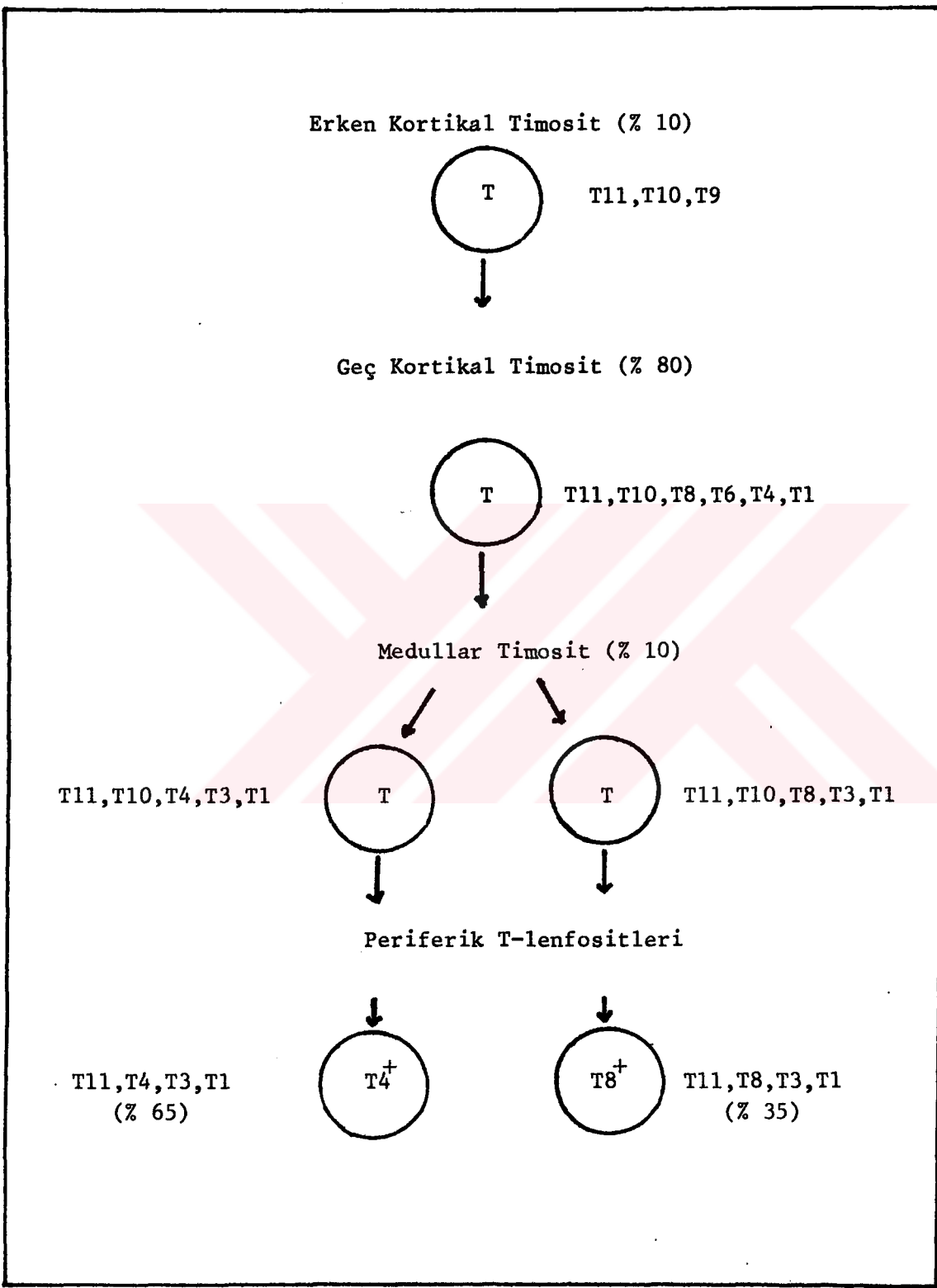
TABLO 1 : T-lenfosit farklılaşmasında görülen yüzey antijenleri ve özellikleri



Timustaki farklılaşmanın ilk basamağında bütün timositlerin % 10'unu oluşturan erken kortikal timositler bulunup, yüzeylerinde T11, T10, T9 T-lenfosit belirleyicilerini taşımaktadırlar. Bütün timositlerin yaklaşık olarak % 80'ini oluşturan geç kortikal timositler ise yüzeylerinde T11 ve T10 belirleyicilerini bulundururken T9'u kaybederek T8, T6, T4 ve T1 belirleyicilerini kazanmaktadırlar<sup>(8)</sup>.

Timusun korteks bölgesinden medulla bölgesine geçen timositlere "medullar timosit" adı verilmektedir. Timositlerin % 10'unu oluşturan medullar timositler iki kuşağa ayrılmakta ve her iki kuşak T11, T10, T3, T1 belirleyicilerini bulundururken, kuşaklardan bir tanesinde T4, diğerinde T8 varlığı görülmektedir<sup>(8,11)</sup>. Bu evrede T3 ifadesiyle birlikte T-lenfositleri mitojen uyarımıyla proliferasyon gösterme veya MLR (Mixed Lymphocyte Reaction) undaki alloantijenlere cevap verebilme fonksiyonlarını kazanmaktadır. Medulladaki ileri farklılaşma, T10 molekülü kaybı ile karakterize olup, bu basamaktan sonra her iki grup da perifere göç etmektedir.

T11<sup>+</sup>, T4<sup>+</sup>, T3<sup>+</sup>, T1<sup>+</sup> özellik gösteren grup, periferik kan T-lenfositlerinin % 65'ini oluşturarak "Yardımcı T-lenfositleri" adını alırken, T11<sup>+</sup>, T8<sup>+</sup>, T3<sup>+</sup>, T1<sup>+</sup> özellik gösteren diğer grup, periferik kan T-lenfositlerinin % 35'ini oluşturarak "Baskılayıcı T-lenfositleri" adını almaktadır<sup>(8)</sup>. (Şekil 2).



ŞEKİL 2 : T-lenfositleri farklılaşma evreleri

Timustan ayrılan T-lenfositlerinin dolaşıma katılarak dalak, periferik lenf düğümü, peyer plakları gibi ikincil lenfoid dokulara göç ettikleri gösterilmiştir. Timositler timik farklılaşmada önemli rol oynayan stromal hücrelerle doğrudan ilişki kurmakta veya stromal salgılardan etkilenerek olgunlaşmaktadırlar. T-lenfositlerinin MHC gen ürünlerini tanıma özellikleri de intratimik farklılaşma sırasında kazanılmaktadır<sup>(8)</sup>.

T-lenfositleri in-vitro şartlarda koyun eritrositleri ile spontan olarak rozet oluşturma yetenekleri sayesinde tanınabilmektedirler ( $E^+$ - Rozet Testi). Gelişmelerinin geç dönemlerinde kazandıkları IgG veya IgM moleküllerinin Fc kısmı için reseptör bulundurmaları ayırıcı bir özellik olarak kabul edilirken, yüzeylelerinde IgA, IgE, IgD moleküllerine uygun olarak reseptör bulundurdukları da gösterilmiştir<sup>(12)</sup>.

Yardımcı T-lenfositleri adı verilen  $T4^+$  hücreler, gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonlarında efektör hücreler olarak görev yapmakta, B- hücrelerinin immünglobulin sentezleyen plazma hücrelerine dönüşmelerine ve sitotoksititeye yardımcı olmakta ayrıca aktif baskılayıcı hücre gelişimini indüklemektedirler<sup>(13)</sup>.

Baskılayıcı T-lenfositleri adı verilen  $T8^+$  hücreler sitotoksik efektör T-lenfositleri ve aktif baskılayıcı T-lenfositlerinden oluşmakta, immünglobulin sentezini ve gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonlarını baskılamaktadırlar<sup>(8)</sup>.

Yardımcı ve baskılayıcı T-lenfositleri kendi işlemlerinde altgruplara ayrılmaktadırlar<sup>(14)</sup>.

Bütün lenfositlerin % 80-90 kadarını oluşturan T-lenfositleri enfeksiyonlara karşı direnç, tümör atılımı, gecikmiş aşırı duyarlılık, immün sistem düzenlenmesi gibi fonksiyonlar göstermekte ve hücrel immüniteyi sağlamaktadırlar<sup>(15,17)</sup>.

#### B - lenfositleri :

Hümmoral immün sistemin temel hücrelerini oluşturan B-lenfositleri, antikor sentezleyen olgun plazma hücrelerinin öncüleri olarak kabul edilmektedir<sup>(8,18)</sup>.

B-lenfositleri membranlarındaki yüzey immünglobulin (SmIg) molekülünün varlığı ile saptanabilmekte ve antijen reseptörü olarak görev yapmakta olan SmIg, fetal karaciğer-kemik iliğindeki antijenden bağımsız farklılaşma işleminin sonucunda kazanılmaktadır<sup>(18,19)</sup>. Yüzey membran immünglobulinleri çeşitli immünglobulin sınıflarına karşı geliştirilen polivalan ve monovalan antiserumlar kullanılarak gösterilebilmektedir.

SmIg molekülünün B-lenfositleri yüzeyinde gösterilmesi, B-hücresinin antijen ile karşılaştığını, yani olgunlaşmasının antijene bağımlı olan ikinci evresini göstermektedir. Pre-B hücreleri hafif zincir oluşumu ve plazma membranlarında IgM molekülünün ortaya çıkması ile B-lenfositlerine dönüşmektedirler<sup>(19)</sup>.

Pre-B ve B-lenfositleri komplemanın C3 bileşeni ve immüngobulin molekülünün Fc parçasına karşı reseptörler içerirler ayrıca B-lenfositleri yüzeyinde Ebstein-Barr Virusü, fare eritrositleri, insülin hormonu için reseptörler ve monoklonal antikolar ile tanınan B1, B2 ve B4 antijenleri de bulunmaktadır<sup>(8)</sup>.

Yüzey molekülünün ortaya çıkmasını takiben ve antijenik uyarımdan önce B-hücreleri diğer SmIg izotiplerini üretmek üzere immünglobulin sınıfı yönünden değişiklik gösterebilmektedir. B-lenfositleri uygun antijenle karşılaştıktan sonra T-lenfositlerinin yardımıyla klonal bir gelişme göstererek, SmIg molekülü ile aynı özellikte Ig molekülleri sentezlemeye başlamaktadır. Bu işlem 2-3 günlük bir yaşam süresine sahip olan sekretuar plazma hücrelerinin farklılaşmalarına yol açmaktadır. Fakat bu klondaki bazı hücreler "Bellek Hücreleri" denilen oldukça uzun yaşam süreli lenfositlere dönüşerek, lenfoid dokuların germinal merkezlerine yerleşmektedirler<sup>(19,20)</sup>.

İnsan B-lenfositlerinin yüzeylerinde "Ia" denilen immünite ile ilgili antijenlerin bulunduğu gösterilmiştir. Yalnız B-hücrelerine özgül olmayan Ia antijenleri ile HLA-D (Human Leukocyte Antigens-D) lokusu gen ürünleri arasında yakın bir ilişki olduğu saptanmıştır<sup>(21)</sup>.

Son yıllarda hibridoma teknolojisinin geliştirilmesi ile B-hücresi yüzey antijenlerini tanıyan özgül monoklonal antikolar üretilebilmiştir<sup>(6,18)</sup>. (Tablo -2)

| B-lenfosit Gelişim<br>Evreleri | Klasik İşaretler |         |     |     | Monoklonal Antikolar |    |     |    |
|--------------------------------|------------------|---------|-----|-----|----------------------|----|-----|----|
|                                | SmIg             | cIg     | tdT | Ia  | cALLA                | B1 | B2  | B4 |
| Lenfosit stem hücresi          | -                | -       | +   | +   | -                    | -  | -   | +  |
| Pre-pre-B hücresi              | -                | -       | +   | +   | +                    | -  | -   | +  |
| Pre-B hücresi                  | -                | + $\mu$ | +   | +   | +                    | +  | -   | +  |
| Erken B hücresi                | +                | -       | -   | +   | +                    | +  | -   | +  |
| Ara B hücresi                  | +                | -       | -   | +   | -                    | +  | +   | +  |
| Olgun B hücresi                | +                | -       | -   | +   | -                    | +  | +/- | +  |
| Plazmasitoid                   | +                | -       | -   | +   | -                    | +  | -   | +  |
| Plazma hücresi                 | +/-              | +       | -   | +/- | -                    | +  | -   | -  |

SmIg : Yüzey membran immünoglobulini  
cIg : Sitoplazmik immünoglobulin  
tdT : Terminal deoksinükleotidil transferaz enzimi  
cALLA : Common akut lenfoblastik lösemi antijeni

TABLO 2 : B-lenfositlerinin farklı gelişim evrelerinde kazandıkları işaretler

B-lenfositleri, T-lenfositlerine göre daha fazla miktarda yüzey uzantılarına sahip olup T-lenfositlerinden farklı bir doku ve organ dağılımı göstermektedirler<sup>(18)</sup>. (Tablo-3).

| Dokular       | (~%)       |            |
|---------------|------------|------------|
|               | T-lenfosit | B-lenfosit |
| Periferik kan | 55-75      | 15-30      |
| Kemik iliği   | <25        | >75        |
| Lenf          | >75        | <25        |
| Lenf düğümü   | 75         | 25         |
| Dalak         | 50         | 50         |
| Bademcik      | 50         | 50         |
| Timus         | >75        | <25        |

TABLO 3 : İnsan dokularındaki lenfosit dağılımı

#### Natural Killer Hücreler (NK):

(Üçüncü Populasyon Hücreleri) : Son yıllarda tümöre, viral ve mikrobik enfeksiyonlara karşı konak immüncesini ve lenfoid hematopoetik hücre populasyonlarını düzenleyen, geniş yapıları ve sitoplazmalarında bulundurdukları azurofilik granülleri ile karakterize LGL (Large Granular Lymphocytes) hücreleri gösterilmiş ve bu hücrelere fonksiyonları nedeni ile Natural Killer (NK) adı verilmiştir<sup>(8,22)</sup>.

Spontan sitotoksitesisi olan ve fenotipik heterojenite gösteren bu hücrelerde aktivitenin tek bir hücre tipi ile sınırlı olmadığı bilinmektedir. NK hücreleri aktivasyonlarının belirli evrelerinde, farklı hücre kuşaklarının özelliklerini göstermektedirler<sup>(22)</sup>.

NK hücreleri yapışıcı (adherent), fagositik özellik göstermeyen, Fc reseptörü bulunan sitotoksik efektör hücreler olarak tanınmaktadır. T-lenfosit yüzey antijenlerinin çoğunu üzerinde bulunduran NK hücreleri, farede Thy1, Lyt1 insanda T1, T3, T8, T10, T11 antijenlerine karşı geliştirilen monoklonal antikolar ile reaksiyon vermektedir. Örneğin NK hücrelerinin % 30-40'ı yüzeylerinde T8, % 82-90'ı ise T11 antijenini bulundurmaktadır<sup>(22,23)</sup>.

Hücre siklusunda  $G_0/G_1$  evrelerinde  $T3^-$ ,  $T11^+$  özellik gösteren NK hücreleri  $S/G_2/M$  evrelerinde transferrin, IL-2 (interlökin-2), HLA-DR antijenlerini yüzeylerinde belirlemeye başlamaktadır<sup>(23)</sup>. Bunlardan başka makrofajlarda bulunup periferik kan T-lenfositlerinin çoğunda bulunmayan Mac1 ve M1 antijenlerini de yüzeylerinde ifade ettikleri gösterilmiştir<sup>(22)</sup>.

NK hücreleri HNK-1 ve Leu-7 monoklonal antikoları ile tanınabilmektedir ancak NK-özümlü olup NK hücrelerinin % 99'unu tanıyan monoklonal antikor, immünglobulinin Fc kısmı reseptöründen yararlanılarak üretilen B 73.1 dir<sup>(23)</sup>.

IL-2 reseptörü taşıyan NK hücreleri, IL-2 ile karşılaştıkları zaman prolifer olmaktadır. Bu durumda insanda M1 antijeni kaybedilip T3 antijeninin ifadesi artmakta, farede ise Thy1 antijeninin ifadesi artmaktadır<sup>(22)</sup>.



Bugün için NK hücrelerinin kaynaklandığı hücre kuşağı ve hedef hücre özgüllükleri tam olarak açıklanamamıştır.

#### MONOKLONAL ANTİKORLAR

Günümüzde birçok hastalığın tanı ve tedavisinde yararlanılan antikorlar, immünglobulin niteliğinde moleküller olup, antijenlere belirli bölgelerden bağlanarak, bir düzen içerisinde eliminasyonlarını sağlamaktadırlar. In-vitro şartlarda tek tip özgüllük gösteren antikor yapıcı hücrelerin diğer antikor yapıcı hücrelerden ayrılması ve kültürde üretilmesi ile sadece belirli bir antijenik bölgeyi tanımak üzere oluşturulan yüksek saflık ve özgüllükteki antikorlara "Monoklonal Antikor" denilmektedir<sup>(24)</sup>.

1973 yılında ilk kez Cesar Milstein ve arkadaşları in-vitro şartlarda fare miyeloma kültürlerinden spontan mutasyon yapmayı başarmışlardır. Daha sonra 1975 yılında George Köhler, antijen ile immünize edilmiş farelerden elde edilen dalak hücreleri ile mutant fare miyeloma hücrelerini kaynaştırarak monoklonal aktikor sentezleyen "Hibridoma-hibrid miyeloma" tekniğini geliştirmiştir<sup>(25)</sup>. Antikor üreten plazma hücreleri ile uygun tümör hücrelerinin kaynaştırılması sonucunda elde edilen hibrid hücreler, bir başka deyişle "ölüm-süzleştirilen" plazma hücreleri, in-vitro veya in-vivo şartlarda bir tümör gibi sınırsız olarak çoğalabilmekte ve bol miktarda istenilen özgüllük ve saflıkta antikor salgılayabilmektedirler<sup>(26)</sup>.

Hibridoma teknolojinin kullanılması, poliklonal antikorların yarattıkları sorunları azaltarak, miktar ve duyarlılık yönünden çok daha fazla yarar sağladığı için gün geçtikçe biyolojik bilimlerde büyük bir önem kazanmaktadır<sup>(24)</sup>.

#### Monoklonal Antikor Üretimi :

Istenilen antijene yanıt veren klonların olabildiğince yüksek tutulması amaçlanarak, bağışıklama yolu ile plazma hücreleri elde edilir. Miyeloma hücre kuşağı ayırıcı bir özellik olarak Hipoksantin-Guanidin-Fosforibozil Transferaz (HGPRTaz) veya Timidin Kinaz enzimlerini bulundurmayan tipte seçilirler<sup>(27)</sup>.

İmmünize fare dalak hücreleri ile mutant miyeloma hücreleri Polietilen Glikol (PEG) veya Sendai virusu kullanılarak kaynaştırılır ve 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekilirler<sup>(28)</sup>.

İnkübasyon sonunda hücre ortamına Hipoksantin Aminopterin Timidin (HAT) eklenmesi ile HGPRTaz bulundurmamayan miyeloma hücreleri ölür ancak B-lenfositinden gelen HGPRTaz sayesinde DNA yapımını sürdürebilmeleri nedeni ile melez hücreler üreyebilirler. Hibrid oluşturmayan normal dalak hücreleri ise in-vitro ortamda bir haftadan fazla yaşamazlar. Bu süre içinde hibrid hücreler kültür plaklarında görülebilir şekilde koloniler oluştururlar<sup>(29)</sup>.

Plak kuyucuklarındaki süpernatanın antikör aktivitesi ELISA veya Solid Faz Radioimmünoassay yöntemleri ile değerlendirilir (24,27).

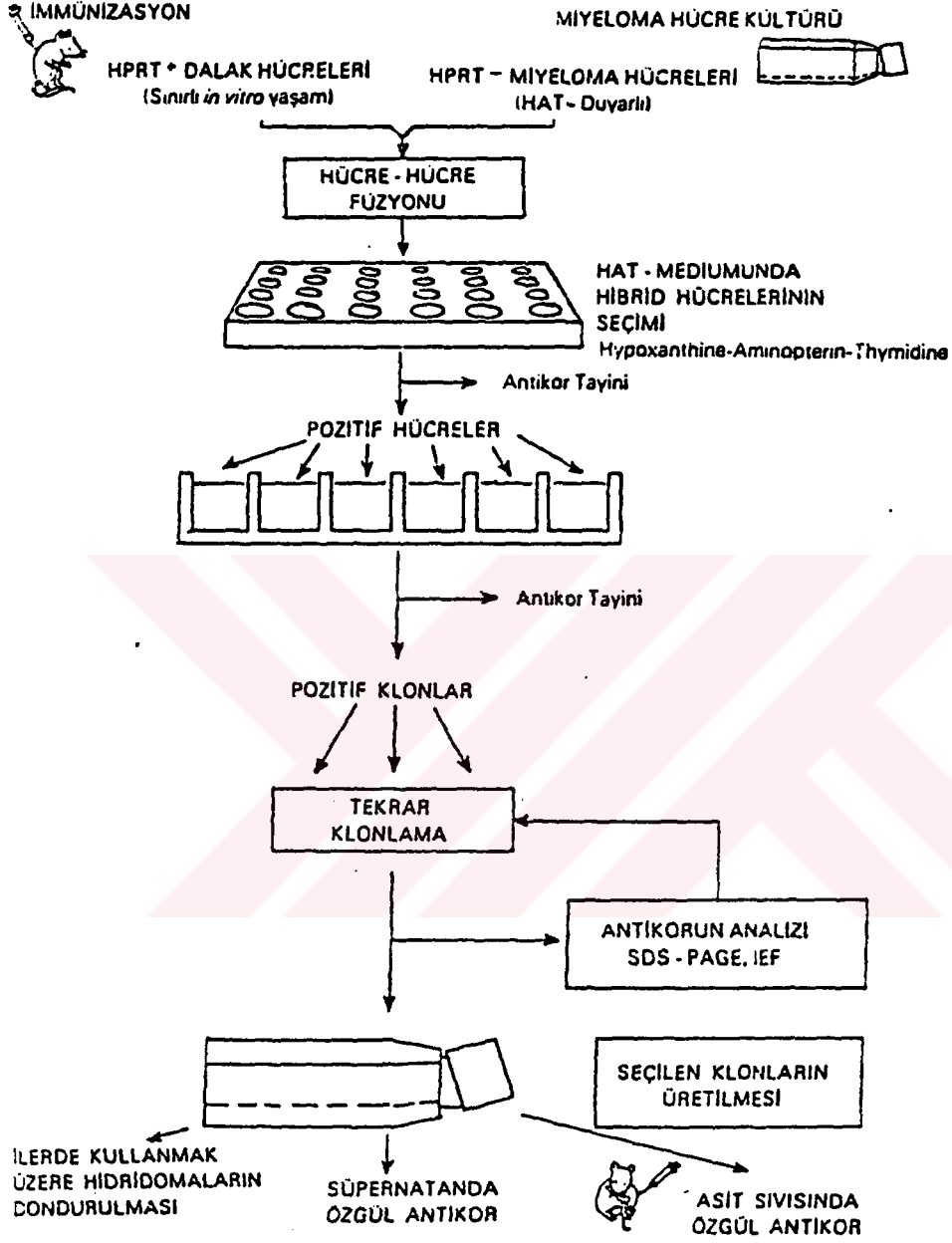
Antikör üretmeye başlayan kuyucukların varlığı halinde hibridomalar başka plaklara aktarılır ve "Limited Dilution" yöntemi ile tek hücreler üretilir. İstenilen özgüllükte monoklonal antikörü sentezlediği tarama yöntemi ile saptanan hibridler, birçok pasaj yapılarak çeşitli plaklarda daha geniş hacimlerde üretilirler<sup>(30)</sup>.

Monoklonal antikör üreten uygun hibridler  $-190^{\circ}\text{C}$ 'de sıvı azot içinde saklanabildikleri gibi, BALB/c farelerin peritonlarına hibridoma enjekte edilmesiyle asit oluşumundan veya deri altına hibridoma yerleştirilmesi ile fare serumundan da elde edilebilirler<sup>(31)</sup>. (Şekil -3)

#### Monoklonal Antikorların Uygulama Alanları :

Monoklonal antikörler günümüzde biyolojik bilimlerin çeşitli alanlarında kullanılmaktadır. Çok geniş uygulama alanı bulan bu teknolojinin özellikle hastalıkların tanı, patogenezi ve tedavilerinde büyük yararlar sağlayacağına inanılmaktadır.

Monoklonal antikörler özellikle normal ve malign neoplastik lenfositlerin hücre yüzey özelliklerinin tanınmasında, T ve B-lenfositlerine ait farklılaşma antijenlerinin belirlenmesinde büyük kolaylıklar sağlamıştır. Bütün T-lenfositlerini tanıyan "Pan-T" monoklonal antikörleri için



ŞEKİL 3 : Monoklonal antikor elde edilmesinde kullanılan standart tekniğin görünümü

(OKT-1, OKT-3, Leu-1, T101, Leu-4, A50 gibi), T-lenfositleri üzerindeki E-reseptörü için (OKT-11), yardımcı T-lenfositleri için (OKT-4, Leu-3a), baskılayıcı T-lenfositleri için (OKT-5, Leu-2), B-lenfositleri için (B1, BA-1) ve insan monositleri için (OKM-1, D5, D6) üretilmiş olan monoklonal antikorlar yaygın kullanım alanı bulmuştur<sup>(30)</sup>.

Birçok ticari firma tarafından bu amaçla üretilen monoklonal antikorlar T ve B-lenfositlerinin, lenfosit alt-gruplarının ve neoplastik hücre gruplarının belirlenmesini sağlamaktadır<sup>(30)</sup>. (Tablo-4)

Özellikle lösemi ve lenfomalar olmak üzere lenfoproliferatif hastalıklarda hücre fenotipi tayininde ve bu hastalıkların sınıflandırılmalarında monoklonal antikorlardan yararlanılmaktadır<sup>(1,32,33)</sup>. Örneğin, CALLA antijenini tanıyan J5 Monoklonal Antikoru, B-lenfosit gelişimine ait Pre-B seviyesindeki önemli bir devreyi göstermektedir<sup>(6)</sup>.

Monoklonal antikorların diğer bir kullanım alanı tümörlerin serolojik taranması, immünohistolojik tanısı in vivo yerleşimlerinin gösterilmesi ve tümör terapisi<sup>(34)</sup>. Hepatoma tanı ve takibinde alfa-fetoprotein ve kolon karsinomlarında karsinoembriyonik antijen tayini için özgül monoklonal antikorlar geliştirilmiştir<sup>(35)</sup>. Bunlardan başka meme, akciğer, over kanserleri, teratoma ve nöroblastoma gibi tümörlerin tanısında kullanılmak üzere de monoklonal antikorlar üretilmiştir<sup>(30)</sup>.

Tablo 5'te Monoklonal antikor tekniği ile tanınan çeşitli antijenler gösterilmektedir<sup>(36)</sup>.

| Ortho <sup>*</sup> | Coulter <sup>**</sup> | Becton<br>Dickinson <sup>***</sup> | Antijen    | Reaktiviteleri  |
|--------------------|-----------------------|------------------------------------|------------|---|
| OKT1               | T1 <sub>A</sub>       | Leu 1                              | T1         | Timus ve periferik T hücreleri  |
| OKT <sub>3</sub>   | T3 <sub>A</sub>       | Leu 4                              | T3         | Periferik T hücreleri   |
| OKT11              | T11                   | Leu 5                              | T11        | Timus ve periferik T hücreleri<br>(koyun eritrosit reseptörü)                             |
| OKT4               | T4 <sub>A</sub>       | Leu 3a,b                           | T4         | Yardımcı-indükleyici T hücreleri  |
| OKT8               | T8 <sub>A</sub>       | Leu 2a,b                           | T8         | Sitotoksik-baskılayıcı T hücreleri  |
| OKT5               |                       |                                    |            | T hücreleri   |
| OKT9               |                       | Transferrin                        | T9         | Erken timositler  |
| OKT6               |                       | Leu6                               | T6         | Common timositler   |
| OKT10              |                       |                                    | T10        | Pan-timositler, erken hemato-<br>poietik stem hücreleri; aktive<br>olmuş T ve B hücreleri |
| OKB7               | B1                    | Leu 14                             | B1         | B hücreleri ve öncülleri  |
|                    | B2                    | Leu 12                             | B2         | B hücreleri ve öncülleri  |
|                    | B4                    |                                    | B4         | B hücreleri ve öncülleri  |
|                    | J5                    | cALLA                              | J5(cALLA)  | Pre-B hücreleri   |
|                    | PCA-1                 |                                    | PCA-1      | Plazma hücreleri  |
|                    |                       | Leu 7                              | HNK        | Null hücreler   |
|                    |                       | Leu 11a,b                          |            | Null hücreler   |
| OKM1               | MO1                   | Leu 15                             | Mo1        | Monositler, null hücreler   |
|                    | MO2                   | Leu M1, Leu M2<br>Leu M3           | Mo2        | Monositler  |
| OKT1a1             | 12                    | HLA-DR                             | Ia-benzeri | B hücreleri, aktive edilmiş<br>T hücreleri, monositler, null<br>hücreler                  |

\* Ortho Diagnostic Systems, Inc, Roritan, NJ

\*\* Coulter Immunology, Hialeah, FL

\*\*\* Becton-Dickinson Monoclonal Center, Inc., Mountainview, CA

TABLO 4 : Mononükleer hücrelere karşı geliştirilen monoklonal antikorlar

---

Monoklonal Antikoru Üretilen Değişik Antijenler

---

|  |   |
|--|---|
| <p>I. Normal Doku Antijenleri</p> <p>Doku grubu antijenleri</p> <p>Lenfosit antijenleri</p> <p>Normal böbrek antijenleri</p> <p>Sperm antijenleri</p> <p>Kan grubu antijenleri</p> | <p>IV. Hormonlar ve Reseptörler</p> <p>Transferrin ve reseptörü</p> <p>Beta-adrenerjik reseptör</p> <p>Asetilkolin reseptörü</p> <p>Östrojen reseptörü</p> <p>Renin</p> <p>Progesterone</p>     |
| <p>II. Tümör Antijenleri</p> <p>Böbrek tümörü</p> <p>Transisyonel hücre tümörleri</p> <p>Prostat tümörleri</p> <p>Nöroblastoma</p> <p>Melanoma</p>                                 | <p>V. Tümör Belirleyicileri</p> <p>Alfa fetoprotein</p> <p>Carcinoembriyonic antijen</p> <p>Prostatik Asit Fosfataz</p> <p>Beta-human chronic-gonodotropin</p> <p>Plasental alkale fosfataz</p> |
| <p>III. Enfeksiyöz Ajanlar</p> <p>Epstein-Barr virusu</p> <p>Toxoplazmosis</p> <p>Herpes simplex</p> <p>Hepatitis B-Antijeni</p> <p>Hemophilus influenza</p>                       | <p>SP-1</p> <p>SSEA-1</p>   |

---

TABLO 5: Monoklonal antikor tekniği ile tanınan çeşitli antijenler.

Günümüzde çeşitli tümörlere karşı geliştirilen monoklonal antikolar hayvan sistemlerinde, insan lösemi lenfoma ve solid tümörlerinde, kemoterapötik ajanlarla konjuge edilip lokal veya metastatik bölgeye gönderilerek tedavi amacıyla kullanılmaktadır<sup>(34,37)</sup>.

## LÖSEMI

Lösemi, etiyojisi bilinmeyen ilerleyici, neoplastik bir hastalık olup, kemik iliği, olgunlaşan kan ve vücut dokularında lökositlerin olgunlaşmamış şekillerinin bulunuşu ile karakterizedir.

### Tarihçe :

Lösemnin farklı bir klinik bulgu olduğu ilk kez 1845 yılında Craigie, Bennett ve Virchow tarafından saptanmıştır. Virchow, hastalıkta görülen hücrelerin kan iltihabını temsil etmediğini göstererek "Lösemi" (Beyaz Kan) deyiminin kullanılmasını önermiştir. Akut seyirli lösemi ilk defa Friedrich (1847) tarafından bildirilmiş, Ebstein (1899) ise akut lösemnin dikkat çekici semptomlarını tanımlamıştır. 1900 yılında Naegeli'nin miyeloblastı tanınması ve 1913 yılında monositik lösemnin Reschard ve Schilling-Torgau tarafından tanımlanması ile bugün sınıflandırıldığı şekilde lösemnin başlıca tiplerinin ayrılması tamamlanmıştır<sup>(38)</sup>.



## Lösemilerin Sınıflandırılması :

Lösemiler klinik gidişleri, hematolojik yapıları ve görülen hücre tiplerine göre genel olarak ikiye ayrılmaktadır.

### I. Akut Lösemiler

### II. Kronik Lösemiler

Akut lösemilerde klinik gidiş hızlı, kemik iliği ve periferik kanda görülen hücre tipi olgunlaşmamış blast hücre olarak saptanmıştır. Kronik lösemilerde klinik gidiş daha yavaş, hastalık kroniktir. Periferik kanda ve kemik iliğinde lenfosit, miyelosit gibi daha olgun hücreler bulunmaktadır<sup>(17)</sup>.

Hücrelerin ışık mikroskopunda görülen morfolojik yapılarına göre geliştirilen F.A.B. (France-American-British) sınıflamasına göre lösemi tipleri aşağıda gösterilmektedir<sup>(39,40)</sup>.

### I) Akut lösemiler

#### A. Lenfoblastik lösemiler (ALL)

- Küçük hücre tipi (L1)
- Geniş-heterojen tip (L2)
- Geniş-homojen tip (L3: Burkitt hücre tipi)

#### B. Miyeloid lösemiler (Akut Non-Lenfoblastik tip: ANLL)

- Matürasyon göstermeyen miyeloblastik lösemi (M1)
- Matürasyon gösteren miyeloblastik lösemi (M2)
- Hipergranüler promiyelositik lösemi (M3)
- Miyelomonositik lösemi (M4)
- Monositik lösemi (M5)
- Eritrolösemi (M6)
- Akut megakaryositik lösemi (M7)

## II) Kronik lösemiler

- Kronik miyelositik lösemi (KML)
- Kronik miyelomonositik lösemi (KMML)
- Kronik lenfositik lösemi (KLL)
- Kronik granülositik lösemi (KGL)

### AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ (ALL) :

Akut lenfoblastik lösemi, klinik ve biyolojik yönden heterojenite gösteren ve çocuk malign hastalıkları içinde en yaygın olan lösemi tipidir<sup>(41)</sup>. İmmünolojide son yıllardaki gelişmeler, lökosit farklılaşması ve lösemnin orjini hakkındaki bilgilere ışık tutmuştur. Monoklonal antikor kullanımı ile insan lenfosit ve granülosit farklılaşma evreleri açıklanmış ve bu sayede klonal proliferasyon gösteren ALL hakkındaki bilgiler artmıştır<sup>(7)</sup>.

ALL altgrupları, monoklonal antikor teknolojisi gelişmeden önce ALL hücrelerinin ışık mikroskopundaki morfolojik yapılarına dayanılarak geliştirilen F.A.B. sınıflamasına göre belirlenmekteydi. Buna göre ALL üç grupta incelenmektedir<sup>(6,42,43)</sup>.

a) L1 tip ALL : Nükleus/sitoplazma oranı yüksek, birkaç nükleoli bulunduran küçük hücrelerle karakterize edilmektedir. Homojen populasyon gösteren bu tip çocukta erişkinden daha sık görülmektedir.

b) L2 tip ALL : Nükleus/sitoplazma oranı düşük, geniş hücrelerle karakterize , morfolojik yönden heterojen bir grup olup erişkinde çocuktan daha yaygın olarak bulunmaktadır.

c) L3 tip ALL : Yaygın olarak intrasitoplazmik ve intranükleer vakuollerin bulunduğu geniş ve homojen hücrelerle karakterize olan bu tip, Burkitt lenfomanın lösemik fazı olarak bilinmektedir.

Günümüzde halen kullanılmakta olan F.A.B. sınıflandırmasının yanı sıra monoklonal antikor teknolojisinin sağladığı olanaklarla ALL altgruplarının sınıflandırılmasına hücre yüzey belirleyicilerine dayanılarak yeni bir yaklaşım getirilmiştir. Lenfosit yüzey belirleyicilerine göre yapılan ALL altgrubu sınıflandırmasında çeşitli araştırmacılar farklı önerilerde bulunmuşlarsa da tüm araştırmacılarca altı tip ALL varlığı kabul edilmektedir.

- a) Null-ALL (Non-T, non-B ALL)
- b) Common-ALL (c-ALL)
- c) Pre-B ALL
- d) B-ALL
- e) T-ALL
- f) NK-tipi ALL

a) Null-ALL : Non-T, non-B ALL olarak tanınan bu tip sınıflandırılmamış ALL'dir. Lenfoid morfoloji açısından heterojen bir grup olup çocukta L1, erişkinde L2 morfolojisi göstermektedir<sup>(44)</sup>.

Lösemik hücre fenotipi  $B1^-$ ,  $B2^-$ ,  $B4^+$ ,  $BA-1^+$ ,  $BA-2^+$ ,  $HLA-DR^+$  özellik göstermektedir<sup>(6,42,46,48)</sup>. Çoğunlukla  $CALLA^-$

blast görülmesine karşın ender olarak CALLA<sup>+</sup> blast bulunduran hastaların prognozları daha kötü olarak saptanmıştır<sup>(45)</sup>.

Null-ALL hücreleri genellikle Terminal deoksinitridil transferaz (TdT) düzeyinde artış göstermektedir<sup>(42)</sup>.

Bütün ALL tipleri içindeki Null-ALL yüzdesi, immünglobulin genlerinin düzenlenmesi (rearrangement) çalışmaları, T-lenfosit  $\beta$  altbirimi tayini ve NK çalışmaları ile gün geçtikçe azalmakta ve Null-ALL diğer gruplar içine dahil edilmektedir<sup>(45)</sup>.

b) Common-ALL : Stem hücre lösemisi olarak bilinen bu tipin kemik iliğinde erken lenfoid hücrelerden kaynaklanan çok immatür bir B-lenfosit malignansisi olduğu düşünülmektedir<sup>(6,42)</sup>.

Common-ALL'de lösemik hücre fenotipi T-lenfosit belirleyicileri yönünden negatiftir. SmIg<sup>-</sup>, cIg<sup>-</sup> (sitoplazmik immünglobulin), HLA-DR<sup>+</sup>, B1<sup>+</sup>, BA-1<sup>+</sup> ve CALLA<sup>+</sup> özellik göstermektedir. Çocukluk tipinde CALLA pozitifliği % 90 olarak bulunmuştur. Blastların hiçbiri koyun eritrositi ile rozet oluşturmazlar<sup>(6,45)</sup>.

Common-ALL bütün ALL'lerin içinde en iyi prognoz gösteren grup olarak bilinmektedir<sup>(6)</sup>.

c) Pre-B ALL : 1978 yılında Vogler ve arkadaşları tarafından tanımlanan Pre-B tipi ALL bütün ALL'lerin % 20'sini oluşturmaktadır. Hastaların % 90'dan fazlası L1 morfolojisi

gösterirken çok ender olarak hastalar L3 morfolojide de bulunabilmektedir. Hastalarda deri altı kitle görülme sıklığı % 25 olup kemik iliği ve M.S.S. relapsı görülebilmektedir. % 25-30 oranında t (1 : 19) genetik anormalliği görülmesi üzerine kalıtsallığı üzerine olan çalışmalar arttırılmıştır<sup>(45)</sup>.

Lösemik hücre fenotipi CALLA<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, B1<sup>+</sup>, BA-1<sup>+</sup>, cIg<sup>+</sup> (μ ağır zinciri), SmIg<sup>-</sup>, kappa ve lambda negatif özellik göstermektedir<sup>(6)</sup>.

d) B-ALL: Akut lenfoblastik lösemilerin % 1'ini oluşturan B-ALL, çocukta Burkitt veya non-Hodgkin lenfomanın lösemik fazı olup, intraabdominal lenfoma ile birlikte görülmektedir<sup>(6)</sup>.

Remisyona dirençli olan B-ALL, relapsa yatkındır ve kötü prognoz göstermektedir. Philadelphia (Ph') kromozomunu bulundurabilen bu tipte t(8 : 14) translokasyonu görülür<sup>(42)</sup>.

F.A.B. sınıflamasına göre L3 tipi olan blastlar oldukça bazofiliktir ve erken eritroblastlara benzemektedirler<sup>(45,47)</sup>.

Lenfoblastlar genellikle IgM olmak üzere yüzeylelerinde SmIg bulundurmakta ve HLA-DR<sup>+</sup>, B1<sup>+</sup>, BA-1<sup>+</sup>, cIg<sup>-</sup> özellik göstermektedirler<sup>(6,45)</sup>.

e) T-ALL : Akut lenfoblastik lösemilerin yaklaşık % 10-15'ini kapsayan T-ALL lenf düğümü ve timusta oluşarak hızla kemik iliği ve beyin omurilik sıvısına geçer<sup>(42)</sup>.

İlk kez 1973 yılında Borella ve Sen tarafından bildirilen T-ALL, yüksek beyaz küre sayısı, erkek ve ileri yaş yatkınlığı , mediastinal kitle varlığı ve kısa yaşam süresi ile tanınmaktadır<sup>(7,45)</sup> .

Japonya ve A.B.D.'de çalışılan T-lenfositli malignansilerinde C tipi retrovirus gözlenmiş ve bu virusa "Human T-cell Leukemia-Lymphoma Virus" (HTLV) adı verilmiştir<sup>(48)</sup> .

T-ALL lösemik hücre fenotipi OKT-1<sup>+</sup>, OKT-11<sup>+</sup>, Pan-T<sup>+</sup>, B1<sup>-</sup>, B2<sup>-</sup>, BA-1<sup>-</sup>, ender olarak HLA-DR<sup>+</sup>, ve CALLA<sup>+</sup> özellik göstermektedir. Olgun T-lenfositleri sadece +4 °C'de koyun eritrositi ile rozet yaparken T-ALL blastları +4 °C'nin yanı sıra +37 °C'de de rozet yapabilmektedir. OKT-1<sup>+</sup>, E-rozet negatif özellikteki hücreler in-vitro şartlarda forbol esterleri ile stimüle edilince E-rozet yapabilme yeteneği kazanmaları nedeni ile Pre-T lenfositli olarak düşünülmektedir<sup>(6)</sup> .

Reinherz ve grubu T-ALL'yi timik farklılaşma düzeylerine göre altgruplara ayırmışlardır. T-ALL'lerin çoğu evre I timositlerde bulunan antijenleri (OKT-9, OKT-10) bulundurlar. OKT-9'un kaybolup OKT-10 ve Leu-1'in korunduğu OKT-6 , OKT-4 ve OKT-8 antijenlerinin bulunduğu, evre II timosit özelliği, T-ALL'lerin % 20'sinde görülmektedir. OKT-6 antijenini bulundurmayan periferik kanda olduğu gibi OKT-4 ve OKT-8 olarak iki gruba ayrılan evre III timositlerinin özellikleri T-ALL'de çok ender olarak görülmektedir<sup>(6,7,11,49)</sup> .

f) NK-tipi ALL : Çocukluk tipi ALL vakalarından birkaçı NK fonksiyonu ile ilgili olarak tanımlanmıştır. Leu-7 pozitifliği, Fc reseptörü, NK hedeflerine bağlanma veya onları öldürme, sitoplazmik granül varlığı ve M1 antijeni NK hücrelerinin belirleyicileridir. Bazı T-ALL vakalarında NK'nın fenotipik ve fonksiyonel özellikleri gösterilebilmiştir. Bu vakalarda blast hücreleri NK hedefi için sitotoksik bulunmuş ve timosit belirleyicisi olan T6 antijeninin varlığı gösterilmiştir<sup>(50)</sup>.

Bu tip vakalarda insidans, orjin, prognoz ve klinik özellikler halen çalışılmaktadır<sup>(45,50)</sup>.

ALL erişkinde çocuklara oranla genellikle daha kötü prognoz göstermektedir. Yapılan çalışmalarda erken Pre-B ALL'nin diğer ALL tiplerine göre en iyi prognoza sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Pre-B ALL'nin, common-ALL'den daha kötü null-ALL'nin ise common-ALL'li hastalardan daha kötü prognoz gösterdiğine ilişkin raporlar vardır. En kötü prognoz ise T ve B-hücre tipi ALL'li hastalarda belirlenmiştir<sup>(6)</sup>.

Tablo 6'da çocukluk tipi ALL'de prognostik faktörler gösterilmektedir<sup>(44)</sup>.

| FAKTÖR              | İYİ PROGNOZ               | ORTA PROGNOZ              | KÖTÜ PROGNOZ                 |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|
| İrk                 | Beyaz                     |                           | Zenci                        |
| Yaş                 | 3-7                       | < 3, > 7                  | > 15                         |
| Cins                | K                         |                           | E                            |
| Morfolojik tip      | L1                        |                           | L2, L3                       |
| İmmünolojik tip     | c-ALL, Pre-B ALL          |                           | T-ALL, B-ALL                 |
| Sitogenetik özellik | Hiperdiploidi             |                           | pH <sub>1</sub> <sup>+</sup> |
| Beyaz küre          | < 10.000/mm <sup>3</sup>  | 10-50.000/mm <sup>3</sup> | > 50.000/mm <sup>3</sup>     |
| Hemoglobin          | > 12 gm./dt               |                           | < 7 gm/dt                    |
| Tromboşit           | > 100.000/mm <sup>3</sup> |                           | < 25.000/mm <sup>3</sup>     |
| İmmunglobulin       | Normal, artmış            |                           | Azalmış                      |
| Lenf düğümü         | Normal                    |                           | Genişlemiş                   |
| Karaciğer           | Normal                    |                           | Genişlemiş                   |
| Dalak               | Normal                    |                           | Genişlemiş                   |
| Cevap zamanı        | 2 hafta                   | 4 hafta                   | Remisyon yok                 |
| M.S.S.etkilenmesi   | Yok                       |                           | Var                          |
| Mediastinal kitle   | Yok                       |                           | Var                          |

TABLO 6 : Çocukluk tipi ALL ler ile prognostik faktörler arasındaki ilişki

#### İNSAN T-LENFOTROPİK VİRUSU (HTLV)

Retroviruslar yapılarında genetik madde olarak tek sarmal RNA bulunduran Retroviridae ailesine dahil olup insanı da kapsamak üzere birçok türde değişik hastalıklara ve malignansilere neden olan viruslardır (2).

1977 yılında Güneybatı Japonya'da kanserli hastalar üzerinde çalışan Uchiyama tarafından klinopatolojik bir terim olan Erişkin Tip T-hücre Lösemi Lenfoma terimi kullanıldıktan kısa bir süre sonra 1980 yılında insan retrovirusu tanımlanmış

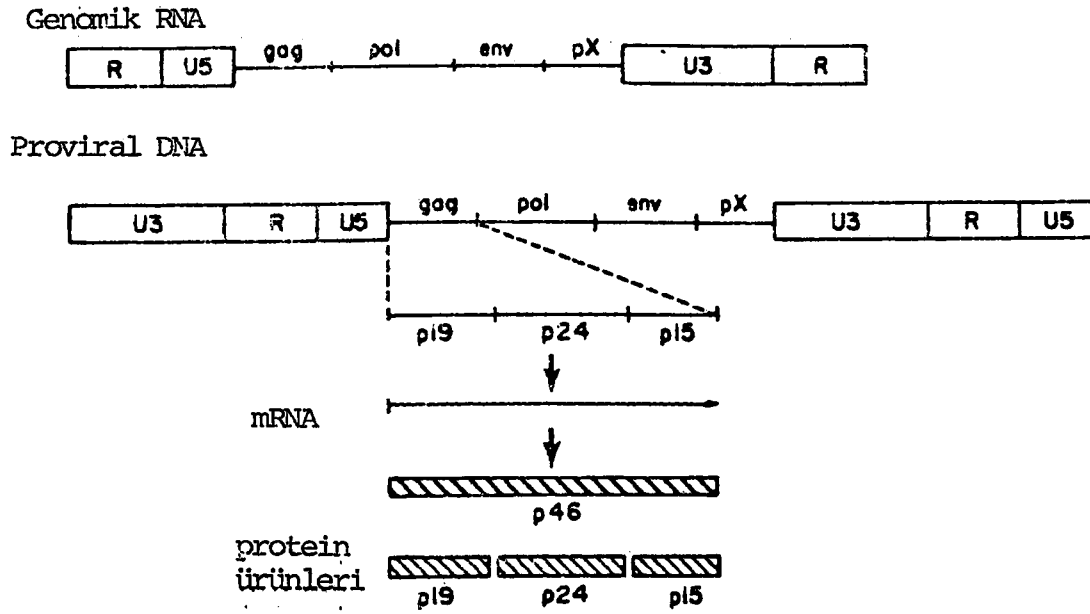


ve T-hücre malignansisi gösteren hastalarda C tipi virusu izole eden Robert Gallo ve arkadaşları bu virusa HTLV adını vermişlerdir<sup>(3,48)</sup>.

Seroepidemiyolojik çalışmalarda öncelikle Güney-batı Japonya olmak üzere Güney Amerika ve Karaib adalarında HTLV-I antikor titresinin yüksek olduğu gösterilerek HTLV'nin bu bölgeler için endemik olduğu açıklanmıştır<sup>(3,51)</sup>. Yoğunlaşan çalışmalar ATL (Erişkin tip lösemi/lenfoma) hastalarında yüksek titrede HTLV-I pozitifliğine New Orleans gibi non-endemik bölgelerde de rastlanabileceğini göstermektedir<sup>(48)</sup>.

HTLV proviral genomu, her iki uçtaki LTR (Long Terminal Repeat : U3-R-U5) ler arasında yer alan gag, pol, env ve px olmak üzere dört bölgeden (9032 baz) oluşmaktadır<sup>(3)</sup>. (Şekil 4).

Viral çekirdeğin major yapısal bileşeni olan gag, p19, p24 ve p15 polipeptidlerini kodlamakta, ürünleri tam olarak belirlenemeyen pol, revers transkriptaz aktivitesi göstermekte, env virion zarf proteinlerini ve glikoproteinleri kodlamakta, px ise 54 kd.luk bir proteini kodlamaktadır<sup>(2,3,52)</sup>.



ŞEKİL 4 : HTLV'nin moleküler yapısı

HTLV'ler üç grupta toplanmaktadır<sup>(52)</sup> :

a) HTLV-I : Erişkin T-hücre lösemisi ile ilişkili bulunarak Japonya ve Karaib adaları için endemik olduğu anlaşılmıştır. HTLV-I virusu olgun T-lenfositlerinden ve Erişkin T-hücre Lösemili hastaların B-lenfositlerinden izole edilebildiği gibi, KML ve Hodgkin'li kişilerde de gösterilebilmiştir.

b) HTLV-II : Saçaklı hücre tipi lösemili (Hairy cell leukemia) hastaların lösemik hücrelerinden izole edilebilmiştir. Bu hastalığın etkeni olduğuna ilişkin çalışmalar devam etmektedir.

c) HTLV-III: Onkojenik olduğu henüz kanıtlanmamakla birlikte bu virusun Akkiz İmmun Yetmezlik Sendromu (AIDS) nedeni olduğu gösterilmiştir.

HTLV, T-lenfositlerine özellikle yardımcı/indükleyici T-lenfositlerine (OKT-3<sup>+</sup>, OKT-4<sup>+</sup>, OKT-6<sup>-</sup>, OKT-8<sup>-</sup>) karşı aşırı

tropizm göstermektedir. Ender olarak baskılayıcı ve sitotoksik T-lenfositlerini de (OKT-3<sup>+</sup>, OKT-4<sup>-</sup>, OKT-6<sup>-</sup>, OKT-8<sup>+</sup>) enfekte ettiği bilinmektedir<sup>(2,4)</sup>.

HTLV'ler T-lenfositlerinde morfolojik ve fonksiyonel değişimlere neden olmakta ve bu hücrelerin immün fonksiyonlarını bozmaktadır. T-hücrelerinin reseptör yapısının veya reseptör yoğunluğunun değişmesi sonucu antijen tanınması bozulmaktadır. Zarf proteinlerinin yaptıkları supresif etkiye bağlı olarak immüsupresyon oluşmakta, TCGF (T-hücre büyüme faktörü) reseptör varlığındaki artış nedeni ile TCGF'den etkilene özelliği bozulmakta ayrıca T-lenfositlerinin HLA-Sınıf II ile ilişkileri ve sitotoksitite yetenekleri değişmektedir<sup>(4,5)</sup>. HTLV ile enfekte olan T-hücreleri poliklonal B-lenfositleri aktivasyonuna da neden olabilmektedirler<sup>(5)</sup>.

#### HTLV'nin Lökomojenik Etkisi :

Klonal artışın hücrelerde, HTLV ile enfekte olduktan sonra görülmesi üzerine HTLV'nin malignansi başlangıcında etiyolojik bir ajan olduğu düşünülmüştür. ATL'li hastalarla yapılan çalışmalar, T-lenfositleri üzerinde viral protein varlığının transformasyonun devamı için değil başlangıcı için mutlaka gerekli olduğunu göstermiştir<sup>(2)</sup>.

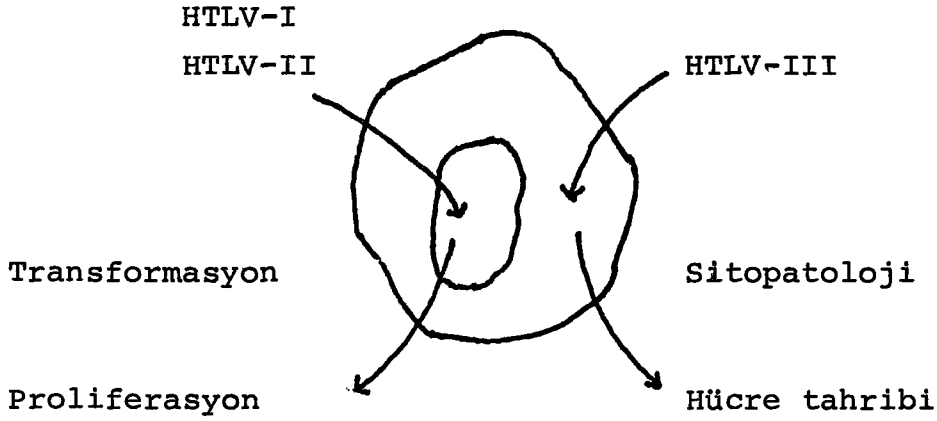
İki bölümde toplanan patojenik hayvan viruslarından kronik lösemi virusları, hastalık oluşturabilmek için uzun bir latent evreye ihtiyaç duyan, konak genomunda spesifik bir bölgeye entegre olan ve cis-acting mekanizma ile monoklonal tümör

geliştirebilen viruslardır. Akut lösemi veya sarkom virusları ise in-vitro şartlarda hastalığı hızla indükleyen, transforme fenotip oluşumu ve bu fenotipin devamı için onkogen ürünlerine ihtiyaç duyan, konak genomunda spesifik bölgeye bağlanmayan, etkilerini trans-acting mekanizma ile gösteren viruslardır. HTLV-I ve HTLV-II her iki gruptan da özellikler bulunduran değişik bir gruptur. In-vitro şartlarda hücreleri transforme etme yeteneği olan HTLV-I, uzun latent bir evreden sonra erişkin tip lösemi oluşturabilmektedir. Onkogen taşımayan HTLV-I ve HTLV-II, virion yapısal genlerinden olmayan LOR (Long Open Reading Frame) dizisini bulundurmakta ve trans-acting mekanizma ile etki göstermektedirler<sup>(4)</sup>.

Konakta yerel veya sistemik tümör gelişimine neden olabilen retroviruslardaki viral onkogenlerin, konak genomuna entegre olup, hayat döngülerine katılarak ve hücre içinde hücrel onkogenleri aktive ederek tümörü indükledikleri düşünülmektedir. Birçok vakada lösemik hücre yüzeyinde retroviral transformasyona neden olabilen, retrovirus tarafından kodlanan proteinler bulunmuştur<sup>(52)</sup>.

Şekil 5'te HTLV'lerin yardımcı T-lenfositini etkileme mekanizmaları gösterilmektedir<sup>(2)</sup>.

HTLV antijeni olarak bilinen p24 ile yapılan çalışmalarda, Erişkin T-hücre Lösemisi olan Japonların % 100'ünde HTLV pozitifliği gösterilmiştir<sup>(4)</sup>. Endemik bölgede sağlıklı kişilerin HTLV-I antikoru yardımı ile incelenmesiyle HTLV-I pozitifliği % 16, non-endemik bölgede ise % 2'den daha az bulunmuştur<sup>(2)</sup>.



MALİGNANSİ

İMMÜN YETMEZLİK

ŞEKİL 5 : HTLV'lerin etki mekanizmaları

T-lenfositlerine karşı tropizm gösteren HTLV viruslarının ALL'li hastaların serumlarında aranmasıyla değişik lenfoid malignansilerin etiolojisinin anlaşılması ve endemik yayılma gösteren bu virusun yeryüzündeki dağılımının ortaya çıkarılması sağlanabilmekte, lenfosit yüzey belirleyicilerini tanıyan monoklonal antikorların kullanılmasıyla da ALL tanısı çok daha güvenilir ve kolay şekilde koyulmakta, altgrup sınıflandırılması yapılabilmektedir.

## MATERYAL ve METOD

Bu çalışma Şubat 1986 - Haziran 1987 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmaya Erişkin Onkoloji ve Pediatrik Hematoloji Ünitelerinin takip ettiği hastalar alınmıştır.

### HASTA GRUBU :

Çalışmaya yaşları 1,5 - 17 arasında değişen 32 çocukluk tip, 17 - 35 arasında değişen 5 erişkin tip olmak üzere 37 Akut Lenfoblastik Lösemili hasta alınmıştır. Vakalar yeni tanı konulmuş ve henüz tedaviye alınmamış hastalar arasından seçilmiştir.

- Lenfosit hücre yüzey işaretlerinin incelenmesi için 37 hastanın tamamı,
- HTLV-I virusuna karşı antikörlerin incelenmesi için 37 hastadan 15'i,
- HTLV-III virusuna karşı antikörlerin incelenmesi için de 15 hasta çalışmaya alınmıştır.

### I- LENFOSİT HÜCRE YÜZEY ANTİJENLERİNİN İNCELENMESİ

Bunun için önce periferik kandan lenfosit ayrımı yapılmış, sonra da iki farklı metodla yüzey antijenleri incelenmiştir. Monoklonal antikör kullanımından başka B-lenfositleri için yüzey immünglobulin testi yapılmıştır.

A. Lenfosit ayırımı (53)

Gerekli malzeme :

1. Heparin : Liquemine<sup>R</sup> Roche-Flacon 5 ml.
2. Ficoll -hypaque : Isopaque<sup>R</sup>, Uppsala, Sweden.
3. 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, % 0.1 gr NaN<sub>3</sub> (Sodyum azide) eklendi. Bu stoktan 1 : 10 oranında serum fizyolojik ile sulandırılarak kullanıldı.

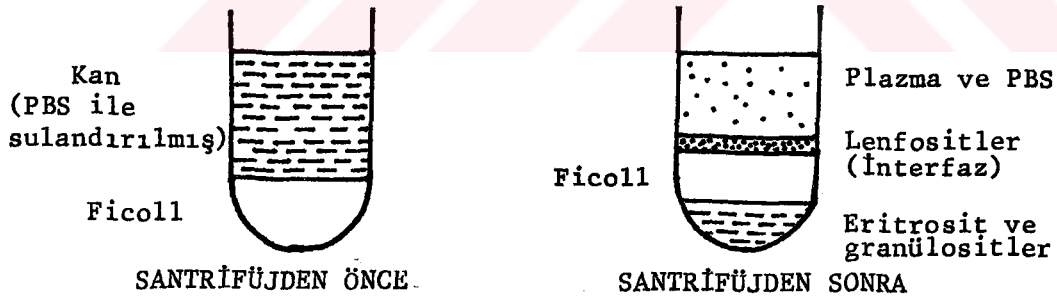
4. Lökosit solüsyonu : 97 ml. distile su + 3 ml. glasiyal asetik asit.

5. Pastör pipetleri.
6. Steril dispozable enjektör ve iğne
7. 40 cc. hacimli yuvarlak dipli cam tüpler
8. 50 cc. hacimli konik dipli plastik tüpler
9. 12 cc. hacimli plastik tüpler
10. Cam pipetler
11. Lökosit pipeti
12. Hemositometre
13. Alkollü pamuk ve turnike

Metod :

- a) Enjektöre 0,1 cc. heparin çekilerek üzerine 10 cc. kan alındı.

- b) Alınan kan plastik tüpe boşaltılarak 1 : 3 oranında PBS ile sulandırıldı.
- c) Enjektöre 3 ml. ficoll alınarak cam bir tüpe boşaltıldı.
- d) Sulandırılmış olan kan, pastör pipeti ile yavaşça ficoll üzerine yayıldı. Bu işlem için önce bir damla kan, pastör pipeti ile tüpün kenarından bırakıldı. Bu bir damla kanın açtığı yol kullanılarak kalan kan ficollün üzerine yayıldı.
- e) 1350 rpm.de 35 dk. santrifüj edildi.
- f) Santrifüj sonunda lenfositler ince bir tabaka olarak interfazda ficoll'ün üzerinde kalır. Ficoll'ün altında eritrositler ve diğer parçalı elemanlar toplanmıştır. Pastör pipeti ile çok dikkatli olarak ficoll'süz lenfositler alındı.



- g) Alınan lenfositler plastik bir tüpe koyularak üzerine PBS eklendi. 4°C'de 20 dk. 1350 rpm.de santrifüj edildi.
- h) Santrifüj sonunda süpernatant atılarak, tekrar PBS eklendi. 10 dk. 4°C'de 1350 rpm.de santrifüj edildi. Aynı işlem bir kez daha yinelenildi.



- 1) Süpernatant atılıp, dipteki hücrelere 1 ml. PBS eklendi. Pastör pipeti ile tam homojen bir karışım sağlandıktan sonra hücre sayımına geçildi.
  - i) Sayım için hemositometrenin pipetine 0.5 işaretine kadar lenfosit solüsyonundan çekildi. Pipetin iki ucundan baş ve orta parmaklarla tutularak karıştırıldı. İlk 2-3 damla dışarı atıldı.
  - j) Hemositometrenin her iki alanına birer damla lenfosit süspansiyonundan damlatıldı.
  - k) Dört köşedeki lenfositler sayılarak 0,05 ile çarpıldı. Böylece lenfosit sayısı  $\times 10^6$ /ml. olarak bulundu.
  - l) 1 ml. de elde edilen hücre sayısını ml.de 2 milyon olacak şekilde ayarlamak gerektiğinde elde edilen sayı ikiye bölünerek kaç cc. hacim sağlanması gerektiği hesaplandı.
- Örneğin ; 14 milyon/ml. hücre elde edilmişse  $14 \times 10^6$ :  
 $2 = 7$  ml. total hacim sağlanmalıdır. Bunun için tüpe 6 ml. PBS eklenmesi gerekir.

**B. B-lenfositlerinin Değerlendirilmesi :**

B - lenfositlerinin incelenmesinde, B-lenfosit yüzey membranında bulunan immünglobulinlerin FITC- işaretli tavşanda hazırlanmış insan immünglobulinlerine karşı (G + A + M) antiserum kullanılarak gösterilmesini esas alan yöntem (SmIg+) kullanılmıştır<sup>(54)</sup>.

Elde edilen periferik kan lenfositlerinden  $1 \times 10^6$  hücre üzerine 0,1 ml. FITC - anti insan Ig (G+A + M) (Behring-Werke, W.Germany) koyulmuş ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda % 20 FCS içeren Medium 199(1x) ile 1000 devirde 10 dk. sürelerle 3 kez yıkanmıştır.

Son yıkamadan sonra süpernatant atılarak 0,1 cc. medium içinde süspansiyon haline getirilmiş ve karışım üzerine 20 mikrolitre % 4'lük Formol-PBS pH 7.2 fiksatifini koyularak epifloresan mikroskopta incelenmiştir. (Carl Zeiss) 200 hücre sayılarak yüzey floresansı pozitif olanlar ( $\text{SmIg}^+$ ) yüzde olarak ifade edilmiştir.

C. Monoklonal antikorlar ile hücre yüzey antijenlerinin belirlenmesi <sup>(55)</sup>

Kullanılan Malzeme :

1) Monoklonal antikor (MoAb) :

Bütün MoAb'lar stoktan dilüe edilerek kullanıldı. Dilüsyon için % 1 sığır serum albumini (BSA), % 5 tavşan serumu (NRS), % 0,1  $\text{NaN}_3$  (Sodyum azide) ve Dulbecco-PBS içeren bir medium kullanıldı. Monoklonal antikorlar, bu mediumla dilüe edilerek çalışmaya alındı.

## 2) Dulbecco PBS - FCS (% 10 FCS)

|                      |                                  |
|----------------------|----------------------------------|
| Dulbecco PBS : 8 gr. | NaCl                             |
| 370 mgr.             | KCl                              |
| 1150 mgr.            | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
| 200 mgr.             | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  |

Bu karışım 1000 cc. distile suda eritilerek 1 mgr. NaN<sub>3</sub> ilave edildi. % 10 FCS eklenerek % 10 FCS-Dulbecco PBS hazırlanmış oldu.

## 3) Florescein isotiocyanate (FITC) ile işaretli anti-mouse Ig serumu (G x MIgG - FITC)

10 x 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 dilüe edilerek kullanılmıştır.

Metod :

1) Daha önce anlatılan yöntemle elde edilen lenfositlerden sayım yapıldıktan sonra 1 cc.de 1 x 10<sup>6</sup> lenfosit olacak şekilde süspansiyon hazırlandı.

2) Kullanılacak monoklonal antikör sayısı kadar, küçük plastik tüplere hücre süspansiyonundan 0,05 ml. (50 µl) otomatik pipetle dağıtıldı. Herbirine fare asit sıvıdan elde edilmiş bulunan anti-Pan-T, ve anti- HLA-DR ile, kültür süpernatantından elde edilen anti-CALLA antikörlerinden 0,05 ml (50 µl) eklendi.

- 3) Bu karışım +4°C'de 10 dk. olmak üzere ara sıra sallayıp karıştırılarak inkübe edildi.
- 4) İki defa 10 dk. olmak üzere 2000 rpm'de, +4°C'de % 10 FCS içeren Dulbecco-PBS ile yıkandı.
- 5) Son yıkamadan sonra hücrelerin üzerine 0.05 ml. Dulbecco PBS-% 10 FCS eklendi.
- 6) Karışım homojen hale getirildikten sonra, tüplerin üzerine 0.05 ml (50 µl) 1 : 10 dilüe edilmiş Goat-antimouse Ig-FITC eklendi.
- 7) Tüpler sallanarak karıştırıldı ve + 4°C'de 10 dk. inkübe edildi.
- 8) Son inkübasyondan sonra hücre süspansiyonu Dulbecco PBS-% 10 FCS ile 2 kez 10 dk. olmak üzere + 4°C'de 2000 rpm'de yıkandı.
- 9) Son yıkamadan sonra, tüp içindeki 0,1 ml. hacimli hücre süspansiyonu üzerine 0,02 ml (20 µl) fiksatif % 4'lük Formal-PBS solüsyonu koyularak, en geç 24 saat içerisinde Carl Zeiss (W.Germany) epifloresan mikroskopla 200'er hücre sayılarak, pozitif immünfloresan veren hücrelerin sayıları saptandı, oranları yüzde olarak ifade edildi.

Çalışmada Kullanılan Monoklonal Antikorlar :

- i) Pan-T monoklonal antikor : (BMA-030 Pan-T-Lymphocytes, Behringwerke AG, W.Germany) IgG<sub>2a</sub> tipinde ve asit sıvısından elde edilen bir monoklonal

antikordur. İnsan periferik kan lenfositleri ve kemik iliği lenfositlerinin % 70  $\pm$  10'u ve periferik kan T-lenfositlerinin % 90'ı ile pozitif reaksiyon vermektedir. Çalışmada optimal 1 : 100 dilüsyonda kullanılmıştır.

ii) HLA-DR, Sınıf -II Antijeni Monoklonal Antikoru : (BMA-020, Behringwerke AG, W.Germany) IgG<sub>1</sub> tipinde monoklonal antikor olup asit sıvısından elde edilmiştir. B-lenfositlerinin % 90'ı periferik kan lenfositlerinin % 12'si, monosit, makrofaj ve aktive T-lenfositleri ile pozitif reaksiyon vermektedir. Optimal dilüsyon olarak 1 : 100 kullanılmıştır.

iii) CALLA Antijeni Monoklonal Antikoru: (RFAL-1,2 Royal Free Hospital, London) IgG<sub>1</sub> tipinde bir monoklonal antikordur ve kültür süpernatantından elde edilmiştir. Pre-B lenfositlerinin hepsi, lenfoblastik lösemi hücrelerinin %70'ine TdT pozitif hücrelerle pozitif reaksiyon vermektedir.

Tablo 7'de çalışmada kullanılan monoklonal antikorlar ve özellikleri belirtilmektedir.

## II- ELISA (Enzyme Linked Immunosorbance Assay) YÖNTEMİ İLE SERUM HTLV-I ANTİKORLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ<sup>(56)</sup>

Kullanılan Malzemeler :

Serumda HTLV-I virusuna ait antikorları tespit etme amacıyla hazırlanan "ELISA Assay For HTLV-I Antibodies in Human Serum" kiti kullanıldı. (Du Pont, Mfg. by Biotech Research

| Monoklonal antikor  | Antikorun özelliği ve nereden alındığı            | Pozitif reaksiyon verdiği hücreler  |
|---|---|---|
| MoAb- BMA - 030<br>(Pan - T, CD-3b)<br>Ticari karşılığı ;<br>Leu-1, OKT-1 | IgG <sub>2a</sub><br>Asit sıvısı<br>(BALB/c fare) | - İnsan periferik kan lenfositleri ve kemik iliği lenfositlerinin % 70 ± 10'u<br><br>- Periferik T-lenfositlerinin % 90'ı ile |
| MoAb -BMA - 030<br>(HLA-DR)<br>Ticari karşılığı:<br>RFDR - 1              | IgG <sub>1</sub><br>Asit sıvısı                   | - Periferik kan lenfositlerinin % 12'si<br>- B-lenfositlerinin % 90'ı<br>- Monosit, makrofaj ve aktive T-lenfositleri ile     |
| MoAb RFAL-1,2<br>(anti-CALLA, CD-10)<br>Ticari karşılığı :<br>J5, BA-3    | IgG <sub>1</sub><br>Kültür süpernatanı            | - Lenfoblastik lösemi hücrelerinin % 70'i<br>- TdT (+) hücreler<br>- Pre-B lenfositleri ile pozitif reaksiyon vermektedir     |

TABLO 7 : Çalışmada kullanılan Monoklonal antikorlar ve özellikleri

Laboratories, Inc. for E.I. Du Pont de Nemours and Company, Inc, Wilmington, Delaware 19898)

Metod :

- a) HTLV-I kaplanmış olan kuyucuklardan herbirine % 10 ısıyla inaktive edilmiş keçi serumu bulunduran PBS-Tween 20'den oluşan serum dilüentten 200 µl koyuldu.
- b) Kültür plağının 3 kuyucuğuna pozitif, 3 kuyucuğuna negatif kontrol serumu 100 µl distile su ile dilüe edildikten sonra, 10 µl olmak üzere eklendi. Diğer kuyucuklarda hasta serumu 10 µl olmak üzere dublike çalışıldı.
- c) Buharlaşmayı önlemek için üzeri kapatılan kültür plağı oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
- d) Inkübasyon sonunda her kuyucuk en az 5 defa olmak üzere PBS-Tween 20 ile yıkandı ve plak hızla sallanarak kurutuldu.
- e) Herbir kuyucuğa 100 µl distile su ile dilüe edilen IgG konjuge alkalın fosfatazdan 100 µl olmak üzere koyuldu.
- f) Buharlaşması önlenen plak, oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
- g) Yıkama işlemi tekrarlandı.
- h) Herbir kuyucuğa 200 µl. olmak üzere substrat solüsyonu koyuldu.
- i) Plak buharlaşması önlenerek oda ısısında 30 dk. inkübe edildi.

- j) Her kuyucuğa 50 µl. olmak üzere sodyum hidroksit (3N) eklendi.
- k) ELISA okuyucusunda 405 nm.lik filtrede kuyucukların absorbanları okundu.
- l) Örnekler HTLV-I antikor pozitifliği yönünden 3 pozitif kontrol kuyucuğunda okunan Optik Dansite'nin (OD) ortalaması alındıktan sonra bulunan sayının ikiye bölünmesi ile elde edilen bazal değerle karşılaştırılarak değerlendirildi. Bazal değerden yüksek olanlar HTLV-I antikor yönünden pozitif, düşük olanlar negatif olarak kabul edildi.

### III- ELISA YÖNTEMİ İLE SERUM HTLV-III ANTİKORLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Kullanılan Malzeme :

E.coliden elde edilen rekombinant HTLV-III antijeni ile hazırlanmış olan "Rekombinant HTLV-III EIA Test" kiti serumda HTLV-III virusuna ait antikorların aranması amacıyla kullanıldı. (Abbott Toxo - G EIA Diagnostic kit Abbot Laboratories, West Germany)

Metod :

- a) Kültür plağının 2 kuyucuğuna negatif kontrol serumu, 3 kuyucuğuna pozitif kontrol serumu ve diğer kuyucuklara 10 µl olmak üzere hasta serumları koyuldu.
- b) Herbir kuyucuğa 400 µl olmak üzere örnek dilüenti eklendi.



- c) Antijen kaplanmış boncuklardan kuyucuklara birer tane koyuldu.
- d) Plağın üzeri kapama kağıdı ile örtüldü ve hızla sallayarak kuyucukların içeriğinin karışması sağlandı.
- e) Su banyosunda 40 °C'de 30 dk. inkübe edildi.
- f) İnkübasyon sonucunda 3 defa distile suyla yıkama yapıldı.
- g) Kuyucuklara 200 µl olmak üzere konjugat eklendi.
- h) Plak, üzeri kapalı olarak 40 °C'de 30 dk. inkübe edildi.
- i) Yıkama işlemi 3 defa tekrar edildi.
- j) Boncuklar, plağın ters çevrilmesi ile el değmeden okuma tüplerine alındı.
- k) Her bir tüpe 300 µl olmak üzere taze hazırlanmış OPD koyuldu. Aynı miktar OPD 2 boş tüpe de kör olarak kullanılmak üzere koyuldu.
- l) Karanlık odada tüpler 30 dk. inkübe edildi.
- m) İnkübasyondan sonra 1 ml. olmak üzere sülfirik asit eklendi.
- n) Spektrofotometrede 492 nm.de absorbanslar okundu. Sınır değeri (negatif kontrol ortalaması) + (0,15 x pozitif kontrol ortalaması) formülü ile hesaplandı. Sınır değerinin üzerinde bulunan değerler pozitif, altında bulunan değerler negatif olarak kabul edildi.

## BULGULAR

## I- Hastaların Klinik ve Genel Özellikleri :

Çalışmaya yaşları 17 ile 35 arasında değişen 5 erişkin tipi, 1,5 ile 17 arasında değişen 32 çocukluk tipi olmak üzere 37 ALL hastası alınmıştır.

Hasta grubunun Beyaz küre değerleri 1.700 - 316.800/ $\text{mm}^3$  arasında değişkenlik gösterirken, % blast sayılarının % 100'e kadar çıktığı görülmüştür.

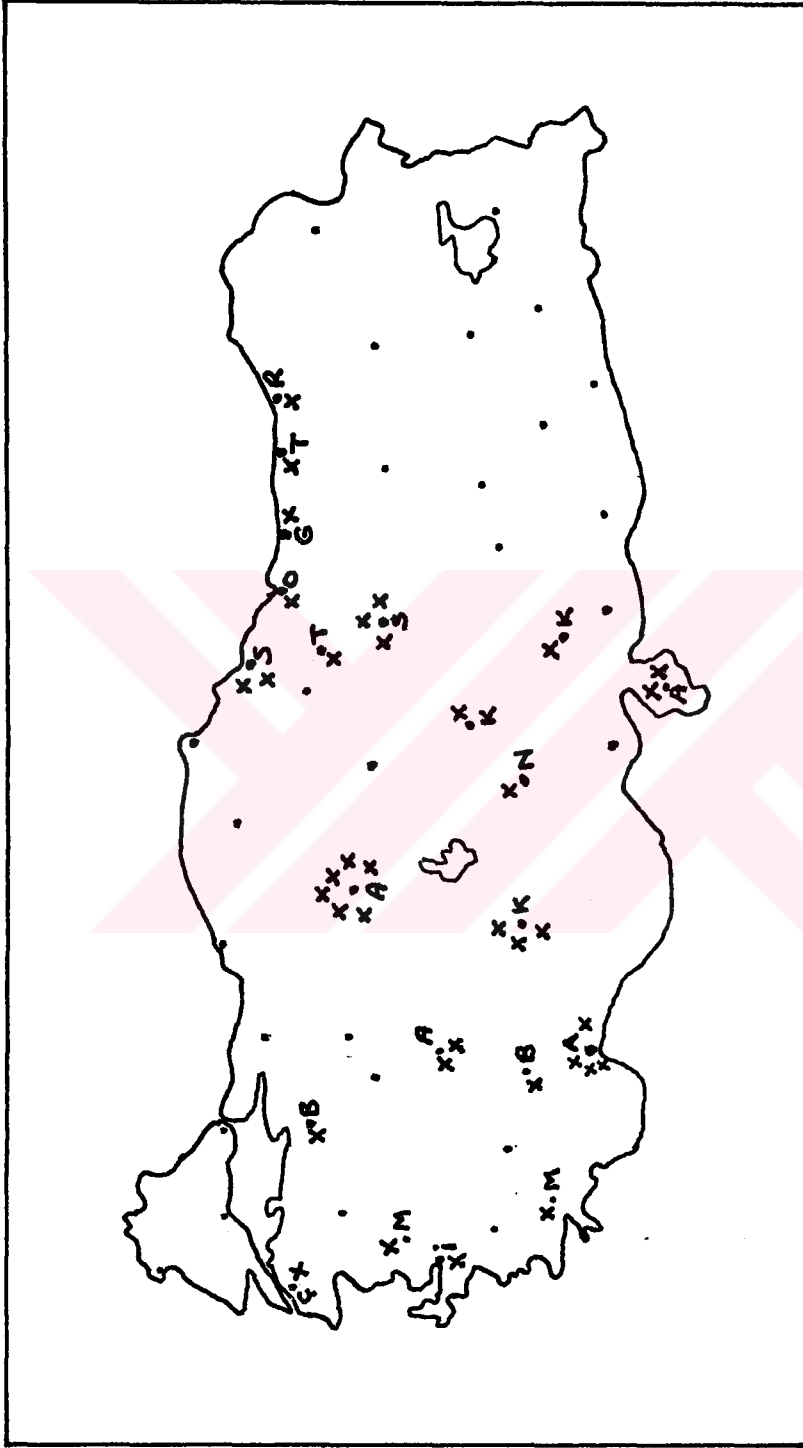
Hastaların bölgelere ve illere göre dağılımı incelenmiş ve dikkat çekici bir özellik bulunamamıştır(Şekil 6) .

Kemik iliği ve periferik yayma tetkiklerinin yapılmasıyla ALL tanısı alan hastalar, standart Oncovin ve Prednisone tedavisine alınmışlar, remisyon hızı ve klinik özellikleri yönünden Erişkin Onkoloji, Pediatrik Hematoloji Üniteleri tarafından değerlendirilmişlerdir.

## II- Hastaların Periferik Kan Blast Hücrelerinin İmmünolojik Fenotipik Özellikleri :

37 kişiden oluşan hasta grubunun periferik kan blast hücreleri monoklonal antikor paneli ile değerlendirilmiştir.

Hastaların klinik, hematolojik ve immünolojik hücre fenotipi özellikleri Tablo 8'de gösterilmektedir.



ŞEKİL 6 : Hastaların illere göre dağılımı

**TABLO 8 : Akut Lenfoblastik Lösemi Hastalarının Klinik, Hematolojik ve İmmünolojik Hücre Fenotipi Özellikleri**

| Hasta No | Adı  | Yaşı  | Cinsi     | İli | Beyaz Küre (mm <sup>3</sup> ) | Blast (%) | F.A.B.    | H Ü C R E F E N O T İ P İ |       |        |           | İZLENİM |
|----------|------|-------|-----------|-----|-------------------------------|-----------|-----------|---------------------------|-------|--------|-----------|---------|
|          |      |       |           |     |                               |           |           | T3 (%)                    | B (%) | DR (%) | CALLA (%) |         |
| 1        | H.A. | 7/E   | Konya     |     | 316.800                       | Silme     | L1        | 3                         | 4     | 51     | +         | Pre-B   |
| 2        | M.G. | 8/K   | Muğla     |     | 88.000                        | 35        | L1        | 16                        | 8     | 57     | 63        | Pre-B   |
| 3        | A.Y. | 3/E   | Ankara    |     | 6.600                         | 8         | L2        | 52                        | 29    | 44     | 15        | Pre-B   |
| 4        | C.Ç. | 3/E   | Rize      |     | 54.400                        | Silme     | L1        | 7                         | 2     | 58     | 52        | Pre-B   |
| 5        | A.Y. | 12/K  | Bursa     |     | 5.500                         | Nadir     | Mixed Tip | 41                        | 33    | 30     | 24        | Pre-B   |
| 6        | M.G. | 5/E   | Sivâs     |     | 59.100                        | Silme     | L2        | 6                         | 9     | 51     | 55        | Pre-B   |
| 7        | E.Ö. | 20/K  | Manisa    |     | 4.200                         | 18        | -         | 4                         | 3     | 83     | 71        | Pre-B   |
| 8        | A.Y. | 5/E   | Ankara    |     | 11.800                        | 46        | L2        | 17                        | 5     | 66     | 81        | Pre-B   |
| 9        | A.T. | 6/E   | Mersin    |     | 15.800                        | 50        | -         | 18                        | 15    | 48     | 44        | Pre-B   |
| 10       | P.B. | 9/K   | Çanakkale |     | 18.000                        | 80        | L3        | 10                        | 2     | 55     | 73        | Pre-B   |
| 11       | H.K. | 17/K  | Antalya   |     | 4.000                         | 34        | -         | 5                         | 3     | 40     | 84        | Pre-B   |
| 12       | Y.G. | 10/E  | Trabzon   |     | 5.400                         | 18        | L3        | 45                        | 33    | 33     | 24        | Pre-B   |
| 13       | N.Ç. | 2,5/E | Antalya   |     | 137.600                       | Silme     | L1,L2     | 3                         | 14    | 9      | 56        | Pre-B   |
| 14       | H.Ö. | 1,5/E | Afyon     |     | 8.600                         | Silme     | L2        | 35                        | 15    | 26     | 23        | Pre-B   |
| 15       | K.A. | 18/K  | -         |     | 14.200                        | 48        | -         | 3                         | 2     | 78     | 86        | Pre-B   |
| 16       | L.S. | 6/K   | Konya     |     | 182.400                       | Silme     | L2        | Negatif                   | 6     | 46     | 64        | Pre-B   |
| 17       | B.Ç. | 8/K   | Ankara    |     | 10.300                        | +         | L3        | 48                        | 14    | 36     | 38        | Pre-B   |
| 18       | Ö.K. | 16/E  | Antalya   |     | 6.900                         | -         | L2        | Negatif                   | 34    | 39     | 34        | Pre-B   |
| 19       | E.Ç. | 3/E   | Hatay     |     | 102.400                       | Silme     | L1        | 1                         | 3     | 74     | 98        | Pre-B   |

(Tablo 8'in Devamı)

| Hasta Adı<br>No | Yaşı<br>Cinsi İli | Beyaz Küre<br>(mm <sup>3</sup> ) | Blast<br>(%) | F.A.B.      | H Ü C R E           |                    |                     |                        | F E N O T İ P İ |  |  |
|-----------------|-------------------|----------------------------------|--------------|-------------|---------------------|--------------------|---------------------|------------------------|-----------------|--|--|
|                 |                   |                                  |              |             | T3 <sup>+</sup> (%) | B <sup>+</sup> (%) | DR <sup>+</sup> (%) | CALIA <sup>+</sup> (%) | İZLENİM         |  |  |
| 20              | C.Ş. 6/E Ordu     | 8.800                            | Silme        | L1          | Negatif             | 20                 | 23                  | 72                     | Pre-B           |  |  |
| 21              | F.Ö. 6/K Ankara   | 9.800                            | 78           | L2          | 13                  | 24                 | 48                  | 58                     | Pre-B           |  |  |
| 22              | O.Ş. 8/E Ankara   | 92.800                           | Silme        | -           | 3                   | 8                  | 2                   | Negatif                | Null-ALL        |  |  |
| 23              | H.Y. 13/E Samsun  | 120.800                          | Silme        | L2          | 3                   | 2                  | 54                  | Negatif                | Null-ALL        |  |  |
| 24              | M.D. 9/E Afyon    | 47.200                           | 68           | Hand Mirror | 6                   | Negatif            | Negatif             | Negatif                | Null-ALL        |  |  |
| 25              | A.S. 7/K Samsun   | 24.000                           | Silme        | L2          | 9                   | 10                 | 60                  | Negatif                | Null-ALL        |  |  |
| 26              | M.A. 25/K Altalya | 2.200                            | 6            | -           | 43                  | 19                 | 32                  | Negatif                | Null-ALL        |  |  |
| 27              | Ş.A. 35/K Niğde   | 2.200                            | 30           | -           | 28                  | Negatif            | 48                  | Negatif                | Null-ALL        |  |  |
| 28              | S.D. 6/E K.Maraş  | 1.700                            | 2            | L1          | 65                  | 19                 | 19                  | Negatif                | T-ALL           |  |  |
| 29              | H.E. 4,5/E İzmir  | 5.000                            | 38           | L1          | 45                  | 11                 | 10                  | Negatif                | T-ALL           |  |  |
| 30              | Y.D. 17/K Sivas   | 2.600                            | 4            | L3          | 68                  | Negatif            | Negatif             | Negatif                | T-ALL           |  |  |
| 31              | P.A. 12/K Ankara  | 14.000                           | 80           | L1          | 15                  | 50                 | 50                  | Negatif                | B-ALL           |  |  |
| 32              | M.Ü. 6/E Kayseri  | 5.800                            | 15           | L2          | 54                  | 20                 | 12                  | 18                     | S.T.*           |  |  |
| 33              | M.C. 9,5/E Sivas  | 2.100                            | -            | L2          | 53                  | 10                 | 18                  | 12                     | S.T.            |  |  |
| 34              | G.Ö. 3/K Burdur   | 4.000                            | +            | L3          | 51                  | 69                 | 54                  | Negatif                | S.T.            |  |  |
| 35              | Y.Y. 6/K Tokat    | 24.800                           | 5            | L1          | 18                  | 58                 | 58                  | 62                     | S.T.            |  |  |
| 36              | Y.A. 5/E Konya    | 5.200                            | 12           | L1          | 44                  | 58                 | 58                  | Negatif                | S.T.            |  |  |
| 37              | M.K. 4/E Giresun  | 2.600                            | -            | L2          | 45                  | 23                 | 11                  | 9                      | S.T.            |  |  |

\* Siniflanamayan Tip

37 hastadan 21 tanesi (% 56.8) CALLA<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> özellikte Pre-B ALL, 3 tanesi (% 8.1) T3<sup>+</sup> özellikte T-ALL, 1 tanesi (% 2.7) SmIg<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CALLA<sup>-</sup>, T3<sup>-</sup> özellikte bulunarak B-ALL olarak sınıflandırılmıştır. 6 hasta (% 16.2) ise elimizdeki belirleyiciler ile pozitivite saptanamadığı için Null-ALL (Non-T, non-B ALL) olarak sınıflandırılmıştır. 37 hastadan 6 tanesi (% 16.2) hiçbir sınıfta gruplandırılmadığı için sınıflandırılmayan tip olarak tanımlanmıştır (Tablo 9).

| ALL - tipi                      | Hasta Sayısı | % Değer |
|---------------------------------|--------------|---------|
| Pre - B tipi                    | 21/37        | 56.8    |
| Null tip<br>(Non-T, Non-B tipi) | 6/37         | 16.2    |
| T - hücre tipi                  | 3/37         | 8.1     |
| B - hücre tipi                  | 1/37         | 2.7     |
| Sınıflanamayan tip              | 6/37         | 16.2    |

TABLO 9 : ALL hastalarının hücre fenotipi sonuçlarına göre dağılımı

IV) ALL Hasta Serumlarında HTLV-I Retroviruslarına Ait Antikorların İncelenmesi :

15 ALL hastasının serumunda HTLV-I antikor düzeyi ELISA testi ile çalışılmış, 405 nm.de Optik Dansite olarak okunmuş ve 0,469 üzeri pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Çalışılan hasta grubunda HTLV-I antikorü yönünden, sadece bir hastada pozitifliğe rastlanmıştır.

Çalışmanın sonuçları Tablo 10'da gösterilmiştir.

| Hasta No                  | Adı/Soyadı | Serum Örneklerinin ELISA Okuyucusundaki Değerleri* |       |              |                   |
|---------------------------|------------|--|-------|--------------|-------------------|
|                           |            | O.D1   | O.D2  | O.D Ortalama |                   |
| 1                         | H.A.       | 0.207  | 0.187 | 0.197        |                   |
| 2                         | M.G.       | 0.164  | 0.163 | 0.163        |                   |
| 3                         | A.Y.       | 0.157  | 0.178 | 0.167        |                   |
| 4                         | C.Ç.       | 0.201  | 0.206 | 0.203        |                   |
| 5                         | A.Y.       | 0.167  | 0.169 | 0.168        |                   |
| 6                         | M.G.       | 0.201  | 0.164 | 0.182        |                   |
| 7                         | E.Ö.       | 0.181  | 0.170 | 0.175        |                   |
| 8                         | A.Y.       | 0.838  | 0.149 | 0.493**      | POZİTİF REAKSİYON |
| 9                         | A.T.       | 0.257  | 0.359 | 0.308        |                   |
| 10                        | P.B.       | 0.372  | 0.360 | 0.366        |                   |
| 11                        | H.K.       | 0.182  | 0.182 | 0.182        |                   |
| 22                        | O.Ş.       | 0.169  | 0.250 | 0.209        |                   |
| 23                        | H.Y.       | 0.355  | 0.164 | 0.259        |                   |
| 32                        | M.Ü.       | 0.218  | 0.201 | 0.209        |                   |
| 33                        | M.C.       | 0.228  | 0.171 | 0.199        |                   |
| Pozitif Kontrol Okumaları |            | 1.012  | 0.970 | 0.835        | 0.939             |
| Negatif Kontrol Okumaları |            | 0.171  | 0.170 | 0.170        | 0.170             |

\* Değerler 405 nm filtrede okunmuş ve Optik Dansite olarak gösterilmiştir.  
0.939/2 : 0.469 üzerindeki değerler pozitif olarak kabul edilmiştir.

\*\* Pozitif reaksiyon

TABLO 10 : Akut Lenfoblastik Lösemili Hasta Serumlarında HTLV-I Retrovirus Antikor Düzeyleri

V) ALL Hasta Serumlarında HTLV-III Retroviruslarına  
Ait Antikorların İncelenmesi :

HTLV-I antikor düzeyi çalışılan 15 kişilik hasta grubunun serumunda HTLV-III antikor düzeyi ELISA testi ile çalışılmıştır. Sonuçlar spektrofotometrede 492 nm.lik filtrede okunmuş ve Optik Dansite olarak değerlendirilmiştir. 0.159 olarak bulunan sınır değerinin üzeri pozitif olarak kabul edilmiştir.

15 kişiden oluşan hasta grubunda, kan transfüzyonu aldığı bilinen bir hastayla birlikte optik dansite olarak 0.288, 0.231 ve 0.177 değerlerini veren 3 hasta HTLV-III antikor düzeyi yönünden pozitif bulunmuştur.

Çalışmanın sonuçları Tablo 11'de gösterilmiştir.



| Serum Örneklerinin Spektrofotometredeki |            |            |       |                   |             |
|---|------------|------------|-------|-------------------|-------------|
| Hasta No                                | Adı/Soyadı | Değerleri* |       |                   |             |
| 1                                       | H.A.       | 0.038      |       |                   |             |
| 2                                       | M.G.       | 0.085      |       |                   |             |
| 3                                       | A.Y.       | 0.231      |       |                   |             |
| 4                                       | C.Ç.       | 0.125      |       |                   |             |
| 5                                       | A.Y.       | 0.288      | **    | POZİTİF REAKSİYON |             |
| 6                                       | M.G.       | 0.177      | **    | POZİTİF REAKSİYON |             |
| 7                                       | E.Ö.       | 0.110      |       |                   |             |
| 8                                       | A.Y.       | 0.104      |       |                   |             |
| 9                                       | A.T.       | 0.081      |       |                   |             |
| 10                                      | P.B.       | 0.050      |       |                   |             |
| 11                                      | H.K.       | 0.026      |       |                   |             |
| 22                                      | O.Ş.       | 0.067      |       |                   |             |
| 23                                      | H.Y.       | 0.054      |       |                   |             |
| 32                                      | M.Ü.       | 0.028      |       |                   |             |
| 33                                      | M.C.       | 0.231      | **    | POZİTİF REAKSİYON |             |
| Kontroller                              |            | OD1        | OD2   | OD3               | OD.Ortalama |
| Pozitif Kontrol Okumaları               |            | 0.251      | 0.404 | 0.950             | 0.678       |
| Negatif Kontrol Okumaları               |            | 0.069      | 0.045 | -                 | 0.057       |

\* Değerler 492 nm. filtrede okunmuş ve Optik Dansite olarak gösterilmiştir.

\*\* Sınır değeri olarak 0.159 olarak bulunmuş ve üzerindeki değerler pozitif olarak kabul edilmiştir.

TABLO 11 : Akut Lenfoblastik Lösemili Hasta Serumlarında  
HTLV-III Retrovirus Antikor Düzeyleri

## TARTIŞMA

Lösemi, insanda kanserlerin % 10'unu oluşturan ve çocuk malignansileri arasında oldukça sık görülen bir hastalıktır . Her yıl 100.000 kişilik populasyonda 6.7 yeni lösemi vakası görülmektedir.

Son yıllarda hücre yüzey antijenlerini tanıyan monoklonal antikolar, immunglobulin genleri ve T-hücre reseptörüne ait gen düzeyindeki çalışmalar sayesinde gerçekleşen immünoloji ve moleküler biyolojideki teknolojik gelişmeler beyaz kürelerin farklılaşmasına, lösemnin temel hücre özelliklerine ve biyolojisine ışık tutmaktadır<sup>(7)</sup>.

Malign transformasyon hücre membranında özgül bazı yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olmakta, böylece hücrelerin büyümesi, farklılaşması ve hücre içi metabolik ve fonksiyonel ilişkileri bozulmaktadır.

Lenfoid hücrelerin malign transformasyonu sonucu oluşan Akut Lenfoblastik Lösemide, lösemik hücreler periferik kan ile kemik iliğinde morfolojik sitokimyasal ve immünolojik özellikleri sayesinde tanınmaktadır. Günümüzde ALL'nin farklı klinik belirtileri olan, prognoz ve hücre fenotipi yönünden değişiklikler gösteren, heterojen bir hastalık olduğu anlaşılmaktadır<sup>(7,41)</sup>. Bu heterojenite ALL hücrelerinin yüzey belirleyicilerine göre yapılan çalışmalarda değişik altgruplarının

olduğunun anlaşılması ile ortaya çıkarılmıştır. ALL vakaları, Pre-B tipi ALL, T-ALL, B-ALL, Null-ALL (Non-T, non-B) NK-cell ALL ve Common-ALL altgrupları olarak tarif edilmektedir.

Bu çalışmada, ALL tanısı alan 37 hastada periferik kan lenfoblast özelliğindeki hücreler, yüzey immünglobulin direkt floresan testi ve uygun monoklonal antikolar kullanılarak indirekt floresan testi ile hücre yüzey antijenleri yönünden incelenmiştir.

Hastalarımızın immünolojik fenotipik analizlerinde % 57'sinin CALLA-antijeni pozitif Pre-B tipi ALL olduğu görülmektedir. Bu hastalardaki blastlar cIg<sup>-</sup>, CALLA<sup>+</sup>, T3<sup>-</sup> özellik taşımaktadır. Piknel ve Heckel grubunun 1979 yılında yaptıkları çalışmalarda inceledikleri hastaların % 58'inin Common-ALL tipi olduğu görülmektedir. Aynı paralelde Chessels ve arkadaşları ise 701 çocuğu içeren serilerinde % 76 oranında Common-ALL vakasına rastladıklarını bildirmişlerdir<sup>(42)</sup>. Common-ALL, kemik iliğinde çok erken dönemde bulunan ve özellikle erken Pre-B tipi hücre grubundan kaynaklanan bir hastalığı ifade etmektedir. Bu hücrelerin büyük kısmının yüzeylerinde HLA-DR (Class-II) Ia-like antijeni bulunmaktadır. Ayrıca Non-T, non-B lenfoblastlar CALLA antijeninin varlığı yönünden altgruplara ayrılarak yaşlara göre incelenecek olursa 1,5 ile 10 yaş arasındaki grupta CALLA pozitifliği % 93 vakada bulunurken, 1,5 yaşın altında bu oran % 49, 1 yaşın altında ise % 14 civarında bulunmaktadır<sup>(42)</sup>. Bu bilgiler,

hücre fenotipi ile lösemnin ortaya çıktığı yaş arasında ilgi olabileceğini düşündürmektedir. Böylece CALLA reaktivitesi veren blastların pozitifliğinin, Non-T, non-B ALL hasta gruplarında takriben % 56 ile % 70 oranında rastlandığı ve çalışmamızda elde edilen sonuçların da bu oranlar içinde olduğu görülmektedir. Tedavi ve prognoz konusunda yapılan çalışmalar bu altgrupun prognoz yönünden diğer ALL tiplerine kıyasla daha iyi olduğuna işaret etmektedir<sup>(6)</sup>. Çalışmamızda altgrup sınıflandırılmasına alınan toplam 37 hastadan 21'i CALLA<sup>+</sup>, T3<sup>-</sup>, SmIg<sup>-</sup> özellikte bulunarak Pre-B tipi ALL olarak değerlendirilmiştir. Yirmibir hastanın sadece iki tanesi tanıdan sonraki devrede idame tedavisi alırken kaybedilmiş, diğerleri takip altında remisyonda devam eden hastalardır.

T-hücre tipi ALL vakaları lösemilerin % 15 ile % 25'ini oluşturmaktadır. Bu tip ALL hastaları yüksek beyaz küre sayısı, mediastinunda kitle ve daha ileri yaş özelliği göstermekte, ayrıca prognoz yönünden ağır seyirli olmaktadır<sup>(6)</sup>. Çalışmamızda incelenen 37 hastanın E-rozet<sup>+</sup> ve T3 (Pan-T) hücre antijeni pozitif blastlarla karakterize T-ALL tipi ancak % 8.1 oranında tespit edilmiştir. Foon 1981'de T-ALL'yi % 15 ile % 25, Chessels ve arkadaşları ise % 12 oranında tespit etmişlerdir<sup>(42)</sup>. T-tipi ALL hastalarının blast yüzey özellikleri incelendiğinde yüksek oranda Ia-like (HLA-DR) antijen ve BA-2 antijen pozitifliği görülmektedir<sup>(6)</sup>. Kısa süre

Önceki çalışmalarda da bu tip ALL hastalarının blast hücre yüzeylerinde T-hücre antijen reseptörü,  $\beta$ -subünitesi gen düzenlemesi tespit edilmiştir. T-tipi ALL tanısı alan bütün vakalarda T11 (Koyun eritrosit reseptör antijeni) pozitifliği bulunmaktadır. Bunun yanı sıra T3/Leu-4 veya yeni sınıflama ile CD3 matürasyon Pan-T antijeni T-ALL hücreleri üzerinde mevcuttur. Vakaların büyük kısmında erken timosit antijenleri tespit edilmektedir. T-ALL , hücrelerin üzerinde bulunan T-hücre gelişim antijenlerine göre 3 gruba ayrılmaktadır : Grup 1 (Leu-9<sup>+</sup>, Leu-1<sup>+</sup>, T11<sup>+</sup>, T3<sup>-</sup>, T4<sup>-</sup>, T8<sup>-</sup>, T6<sup>-</sup>) grup 2 (Leu-9<sup>+</sup>, Leu-1<sup>+</sup>, T11<sup>+</sup>, T3<sup>+</sup>, T4<sup>+</sup>, T8<sup>+</sup>, T6<sup>+</sup>) ve grup 3 ise (Leu-9<sup>+</sup>, Leu-1<sup>+</sup>, T11<sup>+</sup>, T3<sup>+</sup>, T4<sup>+/-</sup>, T8<sup>+/-</sup>, T6<sup>-</sup>) özellik göstermektedir (6,7,11,48) .

Toplam 37 hastamızın 3 tanesi T-tipi olarak belirlenmiş ve Oncovin, Predison, L-Asparaginaz Vincristin tedavisi ile kısa remisyon gözlenmiştir. Bu gözlemler, çalışmamızda monoklonal antikörlerle yapılan hücre fenotipi değerlendirmesi ile T-ALL olarak belirlenen hasta gruplarının klinik seyirlerinin de literatüre paralellik gösterdiğini, daha kısa remisyon süresi olduğunu ve bu altgrubun daha kötü seyirle karakterize olduğuna işaret etmektedir.

Reverse transkriptaz enzimi taşıyan RNA-tipi retroviruslarla yapılan çalışmalarda Gallo ve arkadaşları insan T-lenfotropik virusları olarak bugün bilinen HTLV-I, HTLV-II, HTLV-III ve en son HTLV-IV olmak üzere dört tip farklı retrovirus tarif etmişlerdir. Bu retroviruslar T-hücrelerine ve özellikle T4<sup>+</sup> yardımcı - T hücrelerine aşırı tropizm

göstermektedirler<sup>(5)</sup>. Günümüzde HTLV retrovirusları arasında T-tipi ALL vakalarından bazılarında HTLV-I virusu izole edilmiş, özellikle Japonya ve Karaib adaları bölgesinde tropizm ve diğer gen özellikleri nedeniyle bu virusların onkojenik süreci başlattığı ve lösemik hücre transformasyonuna yol açtığı düşünülmektedir<sup>(3)</sup>. Bu görüşlerden hareketle çalışma grubumuzda T-ALL ve diğer ALL hastalarının serumlarında HTLV-I virus antikorları ELISA yöntemiyle duyarlı bir sınır içinde incelenmiş ve 15 hastadan 1'inde HTLV-I antikorlarına rastlanmıştır. Bu pozitifliğin önem derecesi laboratuvarımıza gelecek yeni moleküler biyoloji imkanları ile incelenecektir. Türkiye'nin çeşitli şehirlerinden gelen ALL hastalarının kaynak yönünden heterojen olduğu ve bir anlamda ülkemizi temsil eden bir grup olduğu kabul edilirse, HTLV-I virusuna ilişkin bu bulgularımız çalışılan hasta gruplarının HTLV-I yönünden genelde negatif olduğunu göstermektedir.

Ayrıca son yıllarda özellikle 1984 ve sonrasında Akkiz immün yetmezlik sendromundan (AIDS) sorumlu olduğu gösterilmiş bulunan HTLV-III virusu Kaposi sarkomu, lenfoma, rektum over ve dil kanserleri gibi malign hastalıklarda da gösterilebilmektedir<sup>(4)</sup>. Herne kadar Gallo ve arkadaşlarının çalışmaları bu tip retrovirusun onkojenik olmadığına işaret etmekte ise de, HTLV-III antikorlarının incelenmesi AIDS teşhisinde, birçok otoimmün neoplastik ve etyopatogenezi bilinmeyen hastalıklarda da araştırma konusu olmuştur.

Çalışmamızda ALL tanısı konulan 37 hastanın Türkiye'den selektif bir örnekleme grubu olarak geldiği düşünülmüş ve bu lenfoproliferatif hastalıklarda HTLV-III virus antikörleri incelenmiştir. Hastalardan sadece 2 tane Pre-B tipi, 1 tane sınıflanamayan tip olmak üzere 3'ünde HTLV-III seropozitivitesi tesbit edilmiştir. Western Blot tekniği ile bu seropozitivitenin yalancı-pozitif olup olmadığı daha güvenilir olarak değerlendirme imkan bulacaktır.

Çalışma grubumuzun % 2.7'sinde blast hücreleri yüzeyinde bulunan immünglobulinlerin varlığına bakılarak, B-tipi ALL tanısı konulmuştur. Bu hastaların muayenelerinde lenfomayı düşündüren bulguya rastlanmamıştır. Gill ve arkadaşlarının 1986 yılında yaptıkları çalışmalarında B-ALL tipinin en az rastlanan FAB sınıflamasına göre L3 (Burkitt-hücre) lösemi tipi olduğu, erken relapsların görüldüğü ve ortalama yaşamın 3 ay civarında olduğu belirtilmiştir<sup>(47)</sup>. Çalışmamızda toplam 37 hastadan sadece 1 hastada SmIg<sup>+</sup> blast hücreleri tespit edilmiş ve aynı blastlarda fenotipin T3<sup>-</sup>, CALLA<sup>-</sup> olarak tespit edilmesi nedeniyle bu hasta B-hücre tipi ALL olarak sınıflandırılmıştır. Kemoterapi şeması diğer gruplara benzer şekilde uygulanmış ve remisyona girme sağlanmıştır. Çalışmada incelediğimiz B-tipi ALL'nin genel özellikleri ve görülme sıklığı A.B.D. ve batı literatürüne benzerlik gösterir niteliktedir. B-hücre tipi ALL'de HTLV-I ve aynı zamanda HTLV-III virusları yönünden yapılan tayinlerde antikor pozitif hastaya rastlanamamıştır.

ALL tanısı konulan hastalarda periferik kan lenfoblast hücreleri monoklonal ve poliklonal antikörler ile değerlendirildikten sonra T3<sup>-</sup>, yüzey Ig<sup>-</sup>, CALLA<sup>-</sup> ve HLA-DR antijeni<sup>+</sup> ise bu hücrelerin daha çok lenfoid seriye ait oldukları ancak Non-T, non-B tipine uydukları kabul edilmiştir. Otuzyed hastamızın altı tanesi (% 16.2) bu gruba alınmıştır. Altı hastamız ise elimizdeki mevcut hücre yüzey belirleyicileri ile tam olarak sınıflandırılmamışlardır ve "Unclassified" tip olarak gruplandırılmışlardır. Bu tip ALL altgrubu literatürde oldukça heterojen bir grubu teşkil etmektedir. Bazı araştırmacılar Common-ALL antijeni (CALLA) taşıyan vakaları, bazıları ise terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzimi taşıyanları bu grup içinde incelemektedirler<sup>(57)</sup>. Ancak, Non-T ve Non-B (Null) ALL erişkinlerde daha sıklıkla görülmektedir<sup>(58)</sup>. Monoklonal antikörlerin immünolojik fenotipi tayinlerine girmesi ile "Null" ALL sınıfından CALLA<sup>+</sup> vakalar çıkarılmaktadır. Null-ALL çocuklarda takriben % 11, erişkinlerde ise % 38 oranında görülmektedir<sup>(42)</sup>. Kita ve arkadaşları<sup>(57)</sup>, ALL tanısı alan 102 hastayı incelemişler ve CALLA<sup>-</sup> non-T ve non-B ALL vakalarında TdT yönünden üç ayrı fenotip olduğunu, bazı gruplarda blast hücrelerinin TdT antijeni yönünden negatif olduğunu ve myeloid-seri antijenlerini taşıyabileceğini göstermişlerdir. Böylece, "Null"-ALL olarak sınıflandırdığımız bazı vakaların lenfosit/myeloid gelişimlere ayrılan devrelerde immatür hematopoietik hücrelerden kaynaklanan lösemiler olabileceği ileri sürülmüştür. Bu nedenle bazı CALLA<sup>-</sup>, SmIg<sup>-</sup> ve TdT<sup>-</sup> hastalarda myeloid spesifik antijenlerin incelenmesi



bu grubun özelliklerine ve heterojenitesine ışık tutabilir. Çalışmamızda myeloid antijenlere özgül monoklonal antikolar kullanılmadığı için "Null"-ALL grubunun bu anlamda alt sınıflamasını yapmak mümkün olamamıştır.

Son yıllarda gelişen yeni moleküler biyoloji teknikleri aracılığı sayesinde DNA-gen düzenlemesi çalışmaları yapılmakta ve hücrelerin daha yüzey antijenleri belirmeden DNA seviyesinde hangi hücre grubuna ait olduğu belirlenebilmektedir. Örneğin ; immünoglobulinlerin ağır veya hafif zincir genlerine ait DNA düzenlemelerinin (gene re-arrangement) Southern blot analizlerinde tesbiti veya T-hücre antijen reseptörü Beta subünitesinin gen düzenlenmesinin gösterilmesi hücreleri B-lenfosit veya T-lenfosit grubuna sokmaktadır. Bu teknikleri kullanarak "Null"-ALL veya "Unclassified-ALL" vakalarının bir kısmı da sonradan T- veya B-ALL tipine girmekte ve gün geçtikçe "Null" adı altındaki ALL vakalarının sayısı azalmaktadır. Bu teknolojiler oldukça pahalı ve geniş kadrolar gerektirmektedir ve henüz imkanlarımız müsait olmadığı için çalışmamızda görülen % 16 oranındaki "Null-ALL" A.B.D. oranlarına kıyasla daha fazla görülmektedir. Bu grup içinde bulunan hastalar konvansiyonel kemoterapi ile kolaylıkla remisyona girmişler ve takibe alınmışlardır. Prognoz ve remisyon oranı yönünden bu gruptaki hastalar diğer çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (42,57).

Null-ALL hastalarında da retrovirüs çalışması yapılmış ve hiçbir hastada serumda HTLV-I ve HTLV-III virüslerine

karşı antikör tesbit edilmemiştir. Ülkemizin değişik şehirlerinden gelen ALL hastalarının bu virüsler yönünden negatif oldukları ilk defa ülkemizden çalışmamız ile gösterilmiş olmaktadır. Lenfotropik özellik taşıyan insan retrovirüslerinin ALL gibi önemli ve ağır seyir gösteren lenfoid neoplazilerde incelenmesi gerek viral etyoloji açısından gerekse yeni sayılan HTLV- virüslerinin ülkemizdeki lösemilerde varlığını ve etkilerini araştırma yönlerinden çok büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, ALL vakalarının Türkiye haritası yönünden dağılımı incelendiğinde hastaların tek bir şehirden, yöreden değil de bütün bölgelerden gelebileceği dikkati çekmektedir. Yöresel bir birikme üzerinde durulmamıştır.

Sonuç olarak, ALL hastalarındaki heterojenitenin uygun monoklonal antikörler ve morfolojik kriterler kullanılarak daha duyarlı ve güvenilir bir teknoloji ile belirlenmesi mümkün olmaktadır. Ülkemizde uygulanan bu teknoloji sayesinde ALL hastalığında blast hücrelerinin hangi hücreden kaynak aldığı ve alt gruplarının tesbiti yapılabilmektedir. Ülkemizin değişik şehirlerinden gelen ALL hastalarının belirli bir bölgede yoğunlaşma göstermedikleri ve retrovirüsler yönünden 4 vaka sayısı dışında pozitivite göstermedikleri saptanmıştır. Bu çalışmaların devamı ve hasta sayılarının arttırılması ALL'nin Türkiye'deki fenotipik özellikleri ve dağılımı hakkında daha geniş bilgi verecektir.

## ÖZET

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Araştırma Laboratuvarında Şubat 1986 ile Haziran 1987 tarihleri arasında Erişkin Onkoloji ve Pediatrik Hematoloji ünitelerinde Akut Lenfoblastik Lösemi tanısı konulan ve takibe alınan toplam otuzyedi hasta uygun monoklonal antikolar kullanarak hücre fenotipi yönünden ve retrovirüslere ait antikolar yönünden incelenmiştir.

ALL tanısı alan hastaların periferik kan lenfoblast hücreleri HLA-DR, Pan-T (T3) ve Common-ALL (CALLA) hücre yüzey antijenleri için uygun monoklonal antikolar ve anti-mouse Ig kullanılarak indirekt immünfloresan yöntemi ile belirlenmiştir. Yüzeylerinde Ig taşıyan (SmIg +) B-hücreleri FITC-işaretli anti-Ig antiserumları kullanarak direkt immünfloresan yöntemiyle tayin edilmiştir. Hastaların periferik kan blast hücreleri diğer mononükleer hücrelerden ayrı olarak değerlendirilmiştir.

Lenfoproliferatif hastalıklarda üzerinde önemle durulan ve T-lenfositlerine tropizm gösteren HTLV-I ve HTLV-III virüslerine karşı serumda antikoların varlığı hastaların serumlarında duyarlı sınırlarda hazırlanmış Enzyme-linked-Immunoassay (ELISA) yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

İncelemeye alınan otuzyedi ALL hastasının yirmibir tanesinde Pre-B tipi ALL, altısında "Non-T, non-B tipi", üçünde T-tipi ve bir hastada B-tipi ALL tesbit edilmiştir. Altı,

hastamız eldeki mevcut yüzey antijene özgül monoklonal antikor paneli ile "Sınıflanamayan = Unclassified" tip olarak gruplandırılmıştır. Elde edilen oranlar daha önce A.B.D. ve Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalara ALL alt gruplarının dağılımı bakımından benzerlikler göstermektedir.

HTLV-I virüsüne ait antikorların serumda varlığı onbeş hastamızda çalışılmış ve sadece bir hastanın serumunda duyarlılık sınırını aşan test sonucu elde edilmiştir. Diğer ondört serum negatif bulunmuştur. HTLV-III virüsü antikorları yönünden onbeş hastanın üçü pozitif bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

1. Fonn, K., Todd. R.: Immunologic Classification of Leukemia and Lymphoma, Blood, 68 : 1, 1986.
2. Lobach, D.F. et al.: Retroviruses and Human Cancer, Cancer Invest, 3 : 145, 1985.
3. Sugamura, K. and Hinuma, Y.: Human Retrovirus in Adult T-cell Leukemia-Lymphoma, Immunol. Today, 6: 83, 1985.
4. Wang-Staal, F. and Gallo, R.: Brief Review : The Family of Human T-lymphotropic Leukemia Viruses, Blood, 65: 253, 1985.
5. Retia, M.S. and Gallo, R.: Retroviruses of Human T-cells, Cancer Surveys, 4 : 313, 1985.
6. Foon, K.A., et al.: Surface Markers on Leukemia and Lymphoma Cells, Blood, 60 : 1, 1982.
7. Fonn, K.A. and Todd, R.F.: Review Immunologic Classification of Leukemia and Lymphoma, Blood, 68 : 1, 1986.
8. Stites, D.A., Stoba, J.D., et al.: Basic and Clinical Immunology. 5th edition Lange Medical Publications, 1984.
9. Gülmezoğlu, E.: Başışıklığın Temelleri, 1983.
10. Corman, L.C., Katz, P.: Symposium on Clinical Immunology I, The Medical Clinics of North America, Saunders, W.B. Company, Vol : 69, No: 3, May 1985.

11. Reinherz, E.L., et al.: Discrete Stages of Human Intrathymic Differentiation, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 77: 1588, 1980.
12. Moretta, L., et al.: Human Lymphocyte Surface Markers, Semin. Hematol., 19 : 273, 1982.
13. Thomas, Y., Ragozinski, L., et al: Functional Analysis of Human T-cell Subsets Defined by Monoklonal Antibodies, J. Immunol, 128 : 1386, 1982
14. Blue, M.L., et al.: Biosynthesis and Surface Expression of T8 by Peripheral Blood T4<sup>+</sup> cells In-vitro, J Immunol, 137 : 1202, 1986.
15. Chen, L.K., et al.: What Is the T-cell Clone ? Hum. Immunol, 17 : 214, 1986.
16. Roitt, I.: Essential Immunology, Blackwell Scientific Publications, 5th Edition, 1984.
17. Müftüoğlu, E.: Klinik Hematoloji, Dicle Üniv. Tıp Fak. Yayınları, s: 309, 1986.
18. Laurence, J.: Lymphocyte Markers in Health and Disease, Disease -a- Month., 30 : 4, 1984.
19. Cristh, W.M., et al.: Immunologic Markers in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, Semin. Oncol., 12 : 105, 1985.

20. Marcu, K.B., et al.: The Views of the Immunglobulin Heavy Chain, *Nature*, 298 : 327, 1982.
21. Reinherz, E.L., et al : Ia Determinants on Human T-cell Subsets Defined by Monoklonal Antibodies, *J.Exp. Med.* 150, 1472, 1979.
22. Kaplan, J.: Natural Killer Cell Lineage and Target Specificity : A Unifying Concept, *Immunol, Today*, 7 : 10, 1986.
23. Bolhvis, D., Gravekamp, C., et al : *Clinics in Immunology and Allergy, Cell-cell Interactions*, 6: 29, 1986.
24. Kansu, E.: Monoklonal Antikorlar, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 27 : 117, 1984.
25. Köhler, G., Milstein, C.: Continuous Cultured of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity, *Nature*, 256 : 495, 1975.
26. Melchers, F. et al.: *Current Topics, Microbial Immunology* 81, Springer Verlag Berlin, 1978.
27. Pollock, R. et al.: *Monoclonal Antibodies : A Power full Tool for Selecting and Analyzing Mutations in Antigens and Antibodies*, *Ann. Rev. Microbiol*, 38: 389, 1984.
28. Diamond, B.A., et al.: *Monoclonal Antibodies : A New Technology for Producing Serologic Reagents*, *N.Eng. J.Med.* 304 : 1344, 1981.

29. Parks, D.R. et al.: Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 76 : 1962, 1979.
30. Kansu, E.: Monoclonal Antibodies, Hacettepe Med. J., 17: 46, 1984.
31. Yelton, D.E., et al.: Monoclonal Antibodies, American Sci. 68 : 510, 1980.
32. Preud'homme, J.L. et al.: Lymphocyte Markers in Human Leukemias and Lymphomas, Semin. Hematol., 21 :296, 1984.
33. Ritz, J., Pesando, J.M. et al.: Use of Monoclonal Antibodies as Diagnostic and Therapeutic Regents in ALL, Cancer Res., 41 : 4771, 1981.
34. Boss, B., et al.: Monoclonal Antibodies and Cancer, Proceedings of the IV Armand Hammer Cancer Symposium. Academic Press. INC, 1983.
35. Rogers, G.T.:et al.: Somatic cell Hybrids Producing Antibodies against CEA, Brit. J.Cancer, 43: 1, 1981.
36. Moon, T.D. et al.: Monoclonal Antibodies in Urology, J. Urol., 130 : 584, 1983.
37. Ritz, J., Schlossmann, S.F.: Utilization of Monoclonal Antibodies in the Treatment of Leukemia and Lymphoma, Blood, 59 : 1, 1982.
38. Küçüküsu, M.N. ark. : Klinik Onkoloji, Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, 1978.



39. Klinik Onkoloji El Kitabı, Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, 1983.
40. Clinical Oncology, International Union Against Cancer, Leukemia, Springer Verlag Berlin, p: 237, 1978.
41. Murphy, S.B.: Acute Lymphoblastic Leukemia, Semin. Oncol, 12 : 79, 1985.
42. Chessells, M.J.: Acute Lymphoblastic Leukemia, Semin, Hematol.,19: 155, 1982.
43. Gralnick, H.R., et al.: Classification of Acute Leukemia, Annals of Internal Medicine, 87: 740, 1977.
44. Fisher, D.S. : Cancer Therapy : ALL and Childhood Leukemia , p: 567.
45. Crist, W.M.: et al.: Immunologic Markers in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, Semin, Oncol, 12: 105,1985.
46. Sen, L. et al.: Acute Lymphoblastic Leukemia in Argentina, Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol., 8: 280, 1986.
47. Gill, P.S. et al.: B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults, Clinical, Morfological and Immunologic Findings, J. Clin, Oncol, 4 : 737, 1986.
48. Temple, J.J. et al.: Adult T-cell Leukemia Lymphoma, Cancer, 58 : 694, 1986.

49. Toribio, M.L., et al.: A Role for  $T3^+4^-6^-8^-$  Transitional Thymocytes in the Differentiation of Mature and Functional T-cells from Human Prothymocytes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 6985, 1986.
50. Kaplan, J. et al.: T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia with Natural Killer Cell Phenotype, Am. J. Hematol., 22 : 355, 1986.
51. Fleming, A.F. et al.: Antibodies to HTLV-I in Nigerian Blood-donors, Their Relatives and Patients with Leukemias, Lymphomas and Other Diseases, Int. J. Cancer, 38 : 809, 1986.
52. Evan, G.T.; Lennox, E.S. : Retroviral Antigens and Tumors, British Medical Bulletin, 41 : 59, 1985.
53. Boyun, A.: Isolation of Lymphocytes, Granulocytes and Macrophages, Scand, J.Immunol., 5 suppl p: 9, 1976.
54. Winchester, R.S., Ross, G.: Methods for Enumerating Lymphocyte Populations in Manual of Clinical Immunology, American Society for Microbiology Washington, D.C., 1976.
55. Reinherz, E.L., et al.: Separation of Functional Subsets of Human T-cell by A Monoclonal Antibody, Proc. Natl, Acad, Sci, USA., 76: 4061, 1979.
56. Saxinger, C. and Galla, R.: Application of the Indirect ELISA Microtest to the Detection and Surveillance of Human T-cell Leukemia-Lymphoma Virus (HTLV), Methods in Lab. Invest., 49 : 371, 1983.

57. Kita, K. et al : Phenotypic Analysis of ALL cells Which Are Classified as Non-T, Non-B and Negative for Common ALL Antigen, Blood, 66 : 47, 1985.
58. Graves M.F,, Lister T.A.: Prognostic Importance of Immunologic markers in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia, N.Eng, J.Med., 304 : 119, 1981.