

Hazırlayan: . Dr Klara Dalva

HİSTOKİMYASAL BOYALAR HK NOTLAR

Rutin Boyalar dışında lokositlerin tanımlanması için spesifik boyalar da kullanılabilir. Özellikle lösemik blastların akut lenfoblastik lösemiden mi yoksa akut miyeloid lösemilerden mi (özellikle de maturasyon göstermeyen miyeloblastik olan M1, akut monoblastik lösemiler, M5A ve akut megakaryoblastik lösemi M7) kaynaklandıkları çeşitli sitokimyasal boyama işlemleri ve Romanowsky boyaları ile alınan sonuçların birlikte değerlendirilmesi ile anlaşılabilir.

Sudan Black B boyası ve Miyeloperoksidaz:

Sudan Black B fosfolipid ve sterollerini boyar. Bu boya, nötrofillerdeki azurofilik ve spesifik granülleri boyarken peroksidazın sadece azurofilik granüllerde bulunduğu bilinmektedir. Sudan black B ile öncül nötrofiller soluk boyanırken olgun olanlar daha koyu boyanır; eosinofilik granüller ise ortası soluk olarak boyanırlar. Monositlerde boyanma olmayabilir ya da az sayıda boyanma gösteren granül izlenebilir. Lenfosit ve lenfoblastlar ise negatiftir; miyeloblastlarda ise az sayıda da olsa pozitif boyanma beklenir.

Peroksidaz reaksiyonunda ise:

Lökositlerin granüllerinde bulunan miyeleloperoksidaz enzimi, ortamda hidrojen peroksit varlığında substrat olarak kullanılan benzidin dihidrokloridi renksiz bir yapıdan mavikahverengi renk veren bir türevine çevirir. Miyeloperoksidaz aktivitesi, nötrofillerin gelişiminin her evresinde mevcut olup; **azurofilik (nonspesifik)** granüllerde bulunur. Eozinofillerde koyu bir boyanma izlenirken; lenfositler, olgun bazofiller, eritroid hücreler boyanma göstermezler. Monositler nötrofillerden daha zayıf renk verir ve granüler çökmeler daha ufaktır. Substrat olarak benzidin HCL yerine DAB (3,3'Diaminobenzidin) HCL kullanıldığında AML olgularında daha çok sayıdaki blastta boyanma olduğu gözlenir. DAB, miyeleloperoksidaz yanı sıra katalaz varlığını da gösterir ve sitokimyasal reaksiyon da hidroperoksidaz olarak adlandırılır. Sudan black B ve hidroperoksidazın miyeleloperoksidazdan daha duyarlı oldukları düşünülmektedir. Enfeksiyonu olan, AML tanısı alan bazı bireylerde bulunan toksik nötrofillerde, nadir görülen doğuştan miyeleloperoksidaz eksikliklerinde peroksidaz aktivitesi izlenmeyebilir.

Esterazlar:

Lökosit esterazlar, naftalen derivesi olan bir esteri hidrolize uğrattırır. Açığa çıkan naftol (veya naftil) hızla ortamda bulunan diazonyum tuzları ile birleşir ve enzimin bulunduğu yerlerde renkli, parlak bir çöküntü oluşur. Kloroasetat esteraz reaksiyonunda nötrofiller ve öncülleri pozitif boyanırken monositler ve öncülleri, diğer kan hücreleri zayıf ya da negatif boyanma gösterirler. Akut lösemilerde kloroasetat esteraz reaksiyon özellikleri, sudan black B ve peroksidaz ile benzerlik gösterse de bu reaksiyon, nötrofil serisi için daha özgündür.

Non spesifik esterazlar (substrat olarak alfa naftil asetat veya alfa naftil butirat kullanılır) ise monositlerde kuvvetle pozitif iken nötrofillerde zayıf reaksiyon verirler. Megakaryositler alfa naftil asetat ile pozitif, alfa naftil butirat ile negatif reaksiyon verirler. Makrofajlar iki substrat ile de pozitif boyanma gösterir. Alfa naftil asetat esteraz, bazofiller ve plazma hücrelerinde pozitifdir, istirahat halindeki T lenfositlerde fokal (yerel odaklar) pozitiflikler görülür, normoblastlar da zayıf boyanma gösterebilirler. Ortama eklenen sodyum florid nötrofiller ve lenfositler dışındaki hücrelerde görülen pozitiflikleri engeller. Alfa naftil asetat esteraz reaksiyonu, akut lenfoblastik lösemilerin az bir kısmında (özellikle T hücreli olanlar) fokal pozitiflikler olarak kendisini gösterebilir, megakaryositik, eosinofilik, ve bazofilik lösemilerde ve eritrolösemilerde görülen eritroblastlarda pozitif izlenebilir.

“Periodik Acid-Schiff” (PAS) Reaksiyonu:

“Periodic Acid”(HIO₄), komşu iki karbondaki hidroksi gruplarını aldehitlere çeviren oksitleyici bir ajandır. Oluşan dialdehitler “Schiff” reaktifi ile birleşerek kırmızı renk veren bir ürün oluştururlar. Kan hücrelerinde **PAS reaksiyonunun pozitif olması hücrelerin glikojen taşıdıklarının bir göstergesidir**. Nötrofiller, eosinofiller, matür formlarında daha kuvvetli olmak üzere evrimlerinin tüm aşamalarında pozitif reaksiyon verirler. Pozitif boyanma granüllerde değil, sitoplazmada serbest olarak izlenir. Miyeloblastlarda az sayıda ufak PAS pozitif granül izlenebilir, monositlerdeki boyanma da çok soluk boyanan ince granüller şeklindedir. Lenfositlerde az sayıda küçük ya da büyük granüller şeklinde boyanma izlenebilir, Normoblastlarda PAS reaksiyonu negatiftir. Eritrolösemiler ve bazı talasemi olgularında nadiren de demir eksikliği anemilerinde ve sideroblastik anemilerde eritroid öncü hücrelerde PAS pozitifliği görülebilir. Akut lenfoblastik lösemilerde lenfoblastların iri PAS pozitif reaksiyon veren yapılar taşıdıkları görülür. Kronik lenfositik lösemi ve Non_Hodgkin lenfoma olgularında , Enfeksiyöz Mononukleozda lenfositlerin artmış sayıda PAS pozitif granüller taşıdıkları görülebilir.

Asit Fosfataz :

Hücrelerdeki asit fosfataz, kendisi için bir substrat olan Naftol AS-BI fosforik asidi hidrolize uğratarak, çözünmez bir yapı olan ve heksazotize edilmiş pararosaniline ile kompleks oluşturan naftol ün açığa çıkmasına sebep olur. Hücrelerdeki renkli çöküntü (kırmızı renkli granüller), asit fosfataz aktivitesinin varlığını işaret eder. Ortamda bulunan L (+) tartarik asit, “Hairy Cell Leukemia”(HCL) hücreleri dışında çeşitli hücrelerde bulunan asit fosfataz izoenzimlerini inhibe eder. Normal ve anormal lokositlerin çoğunda asit fosfataz aktivitesi vardır. Monositler, nötrofiller ve öncülerinden daha koyu boyanır. T lenfositler zayıf pozitiflik verirken B lenfositler reaksiyon göstermez. TRAP (Tartarik asit Rezistan Asit Fosfataz) pozitifliği ise HCL(saçlı hücreli lösemi) için karakteristik olup; bu hücrelerde nadiren negatif reaksiyon görülebilir.

Nötrofil Alkalen Fosfataz

Nötrofillerin metamiyelositten segmente kadar olan evrelerinde bu enzimin üçüncü bir granüler bölmede yer aldığı düşünülmektedir. Enzim, alkali bir ortamda, diazonyum tuzlarının (“fast blue” veya “fast violet) varlığında, substratı olan bir Naftol fosfat ile karşılaşınca onu hidrolize edip, ortama fosfat ve arilnaftolamid salınmasına sebep olur. Arilnaftolamid hemen diazonium ile reaksiyona girip bir azo boyası oluşturur. Zıt boyanma da sağlandıktan sonra boyanmanın koyuluğuna göre 0-4 arasında bir skorlama yaparak 100 lokosit sayılır ve skorları toplanır. Bu şekilde 0-400 arasında bir skor bulunması gerekecektir. Referans değerlerin her laboratuvar tarafından belirlenmesi gerekse de skorun normalde 20-100 arasında olması beklenmektedir.

Enfeksiyonlarda, Polisitemia Vera, Hodgkin Hastalığı, ve bazı miyelofibroz durumlarında skorun yükselmesi beklenirken; Kronik Miyeloid Lösemi, Akut Miyeloid Lösemiler, Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri, aplastik anemi, bazı viral enfeksiyonlar özellikle de Enfeksiyöz Mononukleoz ile aktivite azalmaktadır.

