

# KLL vakalarında akım sitometri analizi ile $\kappa$ ve $\lambda$ hafif zincir ekspresyonlarının değerlendirilmesi

## *Evaluation of $\kappa$ and $\lambda$ light chain expressions by flow cytometry analysis in cases of CLL*

Çiğdem Özdemir\* Filiz Yavaşoğlu\*\* Tülay Köken\*\*\*

\* Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji AD., Afyonkarahisar, Türkiye

\*\* Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Hematoloji BD, Afyonkarahisar, Türkiye

\*\*\* Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD., Afyonkarahisar, Türkiye

**Başvuru Tarihi:** 19 Temmuz 2020

**Kabul Tarihi:** 01 Aralık 2020

### ÖZET

**Amaç:** B lenfositlerinin klonalitesinin akım sitometri analizi ile doğrulanması Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) tanısında önemli bir yere sahiptir. Bu retrospektif çalışmada KLL hücrelerinin monoklonalitesinin göstergesi olarak hangi yüzey hafif zincir paterni gösterdikleri araştırıldı.

**Gereç ve Yöntem:** 33 KLL hastasının (12 kadın/ 21 erkek) periferik venöz kanına ait akım sitometri sonuçları geriye dönük incelenmiştir. KLL immunfenotipleme panelinde yer alan antikorların uygulanması ve lysing prosedüründen sonra elde edilen örneklerin okuma sonuçları değerlendirildi. CD19 ve CD5'i birlikte eksprese eden hücreler KLL hücreleri, olarak kabul edildi ve bu hücrelerin monoklonalitesini değerlendirmek için kappa ve lambda hafif zincir ekspresyonları değerlendirildi.

**Bulgular:** Tüm vakalar değerlendirildiğinde kappa monoklonalitesi gösteren vaka yüzdesi %30.3 iken lambda monoklonalitesi gösteren vaka yüzdesi %51.5 olduğu görüldü. %18.2 vakada da her iki hafif zincir ekspresyonunun da olmadığı görüldü.

**Sonuç:** Çalışmaya alınan hastalarımızda KLL hücrelerinde en sık lambda hafif zincir restriksiyonu gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kronik Lenfositik Lösemi; Akım Sitometri; kappa/lambda

Tülay Köken: 0000-0001-5510-9415  
Çiğdem Özdemir: 0000-0003-2129-3044  
Filiz Yavaşoğlu: 0000-0003-1935-9235

2011-KAEK-2 kodlu etik kurulun 2020/292 sayılı kararı

**Yazışma adresi:** Tülay Köken  
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp  
Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD., Afyonkarahisar,  
Türkiye  
e-mail: tkoken1967@yahoo.com

### ABSTRACT

**Objective:** Confirmation of the clonality of B lymphocytes by flow cytometry analysis has an important role in the diagnosis of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). In this retrospective study, we investigated which surface light chain pattern they showed as indicative of the monoclonity of CLL cells.

**Material and Methods:** Flow cytometry results of 33 CLL patients (12 women / 21 men) were examined retrospectively. The reading results of the samples obtained after the application of the antibodies in the CLL immunophenotyping panel and the lysing procedure were evaluated. Cells that co-express CD19 and CD5 were considered CLL cells, and kappa and lambda light chain expressions were evaluated to the monoclonity of these cells.

**Results:** When all cases were evaluated, the percentage of cases showing kappa monoclonity was 30.3%, while the percentage of cases showing lambda monoclonity was 51.5%. It was observed that both light chain expressions were absent in 18.2% of cases.

**Conclusion:** In our patients, lambda light chain restriction was observed most frequently in CLL cells.

**Keywords:** Chronic Lymphocytic Leukemia; Flow Cytometry; kappa/lambda

### GİRİŞ

Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) kemik iliğinde bulunan tek bir hücrenin DNA'sında sonradan meydana gelen değişiklik nedeniyle, morfolojik olarak olgun görünümlü küçük monoklonal B lenfositlerinin ilerleyici birikimi ile karakterize lenfoproliferatif bir hastalıktır.

KLL tanısı için, National Comprehensive Cancer Network (NCCN), International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) ve European Society of Medical Oncology (ESMO) ortak yayınladıkları rehberde periferik kanda B lenfosit sayısının  $\geq 5 \times 10^9$  /L olması ve dolaşımdaki B lenfositlerinin klonalitesinin akım sitometri analizi ile doğrulanması gerektiği konusunda hemfikirdir (1, 2, 3). NCCN, akım sitometri analizi ile immünofenotipleme için, kappa/lambda, CD19, CD20, CD5, CD23 ve CD10 hücre yüzeyi markırlarının kullanılmasını önermektedir. Neoplastik B hücrelerinin CD19, CD5, CD23 eksprese ederken CD20 ve monoklonal yüzey immünooglobulinin (slg) zayıf eksprese etmesi immünofenotiplemede tanı ölçütü olarak gösterilmektedir. KLL tanısında moleküler anormallikler gösterilmekle beraber, hiçbir KLL için spesifik olmadığından immünofenotipleme KLL tanısında önemli bir rol oynamaktadır.

Neoplastik B hücrelerinde hafif zincir ekspresyonlarının akım sitometri analizi ile gösterilmesi klonaliteyi doğrulamanın bir yoludur (4). İmmünooglobulinlerin kappa ve lambda olmak üzere iki tip hafif zinciri vardır. Normal bir B hücresi ya kappa ya da lambda hafif zincirinden sadece birini eksprese eder. Sağlıklı kişilerde B lenfosit popülasyonları yaklaşık olarak 2:1 oranında kappa:lambda hafif zincirleri ekspresyonunu gösterirken (5), 3: 1 ve 0.3: 1 aralığının dışında bir oran genellikle monoklonal (3.0 ila 0.3) olarak kabul edilir (6). Araştırmalar malign hücrelerin, genetik bir transformasyon ve tek bir hücrenin proliferasyonundan kaynaklandığı hipotezini uzun zamandır desteklemektedir. Bu nedenle, tek bir hücre hattından proliferen olan malign B hücreleri bir klon olarak tanımlanır. Bu klonal artış da "monoklonal hafif zincir restriksiyonu" olarak adlandırılır. Monoklonal hafif zincir restriksiyonu neoplastik B hücrelerinin bir göstergesi olarak kabul edilmekle birlikte her iki hafif zinciri ayrı ayrı eksprese eden B hücre popülasyonu içeren KLL vakaları (biklonal) (7,8) ile her iki hafif zinciri birlikte eksprese eden B hücre popülasyonu içeren KLL vakaları (dual) da gösterilmiştir (9).

Bu çalışmada KLL tanısı alan vakalarımızın lenfositlerinde hangi yüzey hafif zincir paterni gösterdikleri araştırıldı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Merkezi Hematoloji kliniğinde, klinik, morfolojik ve immunfenotipik bulgular ile tanı almış yaş ortalaması 64 (en küçük 44, en büyük 78) olan 33 KLL hastasının (12 kadın/ 21 erkek) periferik venöz kanına ait akım sitometri sonuçları geriye dönük incelenmiştir (2011-KAEK-2 kodlu etik kurulun 2020/292 sayılı kararı ile onay alınmıştır).

### Akım Sitometri Analizi

Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere alınan periferik venöz kan örnekleri 24 saat içerisinde işleme alınan hastaların sonuçları çalışmaya alınmıştır. KLL immunfenotipleme panelinde yer alan (CD19, CD20, CD5, CD23, CD38, CD10, CD2, CD200, CD7, CD79a, CD34, CD117, CD43, FMC7, CD14, CD33, MPO, kappa ve lambda hafif zincir) antikörlerin uygulanması ve lysing prosedüründen sonra elde edilen örneklerin okuma sonuçları değerlendirildi. Okumalar Beckman Coulter, (Miami, USA) firmasına ait Navios Ex model cihazında, yine aynı firmaya ait antikörler kullanılarak gerçekleştirildi. İlk olarak CD45-Side Scatter (SSC) grafiği üzerinde lenfositler işaretlendi. Bu popülasyonda CD19 ve CD5'i birlikte eksprese eden hücreler KLL hücreleri, olarak değerlendirildi.

B hücrelerinin monoklonalitesini değerlendirmek için kappa ve lambda hafif zincir ekspresyonları değerlendirildi. Kappa: lambda oranı 3:1 ve 0.3:1 aralığının dışında olanlar monoklonal olarak kabul edildi (6).

### İstatistik

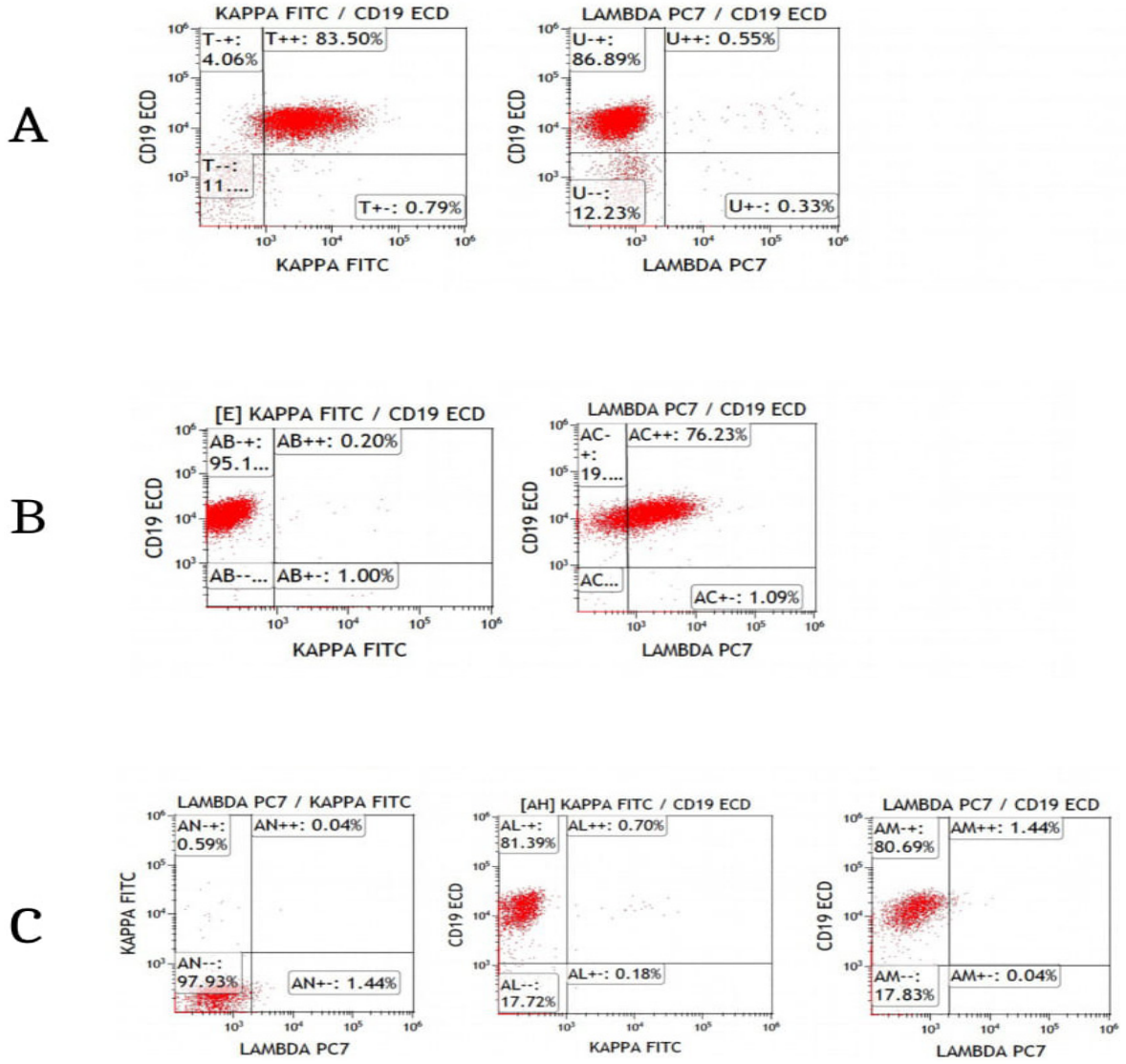
Hücre yüzeyinde kappa ve lambda hafif zincir eksprese eden KLL hücrelerinin yüzdeleri akım sitometri cihazının verilerinden elde edilmiştir.

## BULGULAR

Akım sitometri ile belirlenen yüzey hafif zincir ekspresyonları üç farklı patern ortaya koydular. İlk patern sadece kappa hafif zincir eksprese ederken (n:10) (Şekil 1A), ikinci patern sadece lambda hafif zinciri (n:17) (Şekil-1B), üçüncü patern de hafif zincir eksprese etmediği görüldü (n:6) (şekil-1C). Tüm vakalar değerlendirildiğinde kappa monoklonalitesi gösteren vaka yüzdesi %30.3 iken lambda monoklonalitesi gösteren vaka yüzdesi %51.5 olduğu görüldü. %18.2 vakada da her iki hafif zincir ekspresyonunun da olmadığı görüldü (Tablo 1). Şekil 2'de Hafif zincir eksprese eden KLL hücrelerinin yüzdeleri verilmiştir. KLL hücrelerinin lambda klonite gösteren vakalarda kappa klonite gösteren vakalardan daha fazla hafif zincir eksprese ettiği görülmüştür.

**Tablo 1.** KLL hastalarının hafif zincir ekspresyon paternleri  
**Table 1.** Light chain expression patterns of CLL patients

	Kappa Klonal	Lambda Klonal	Kappa/Lambda
Hasta Sayısı	10	17	6
(Kadın/Erkek)	(4/6)	(6/11)	(2/4)
Hasta %	%30,3	%51.5	%18.2
% (Kadın/Erkek)	(12.1 / 18.2)	(18.2 / 33.3)	(6.1 / 12.1)



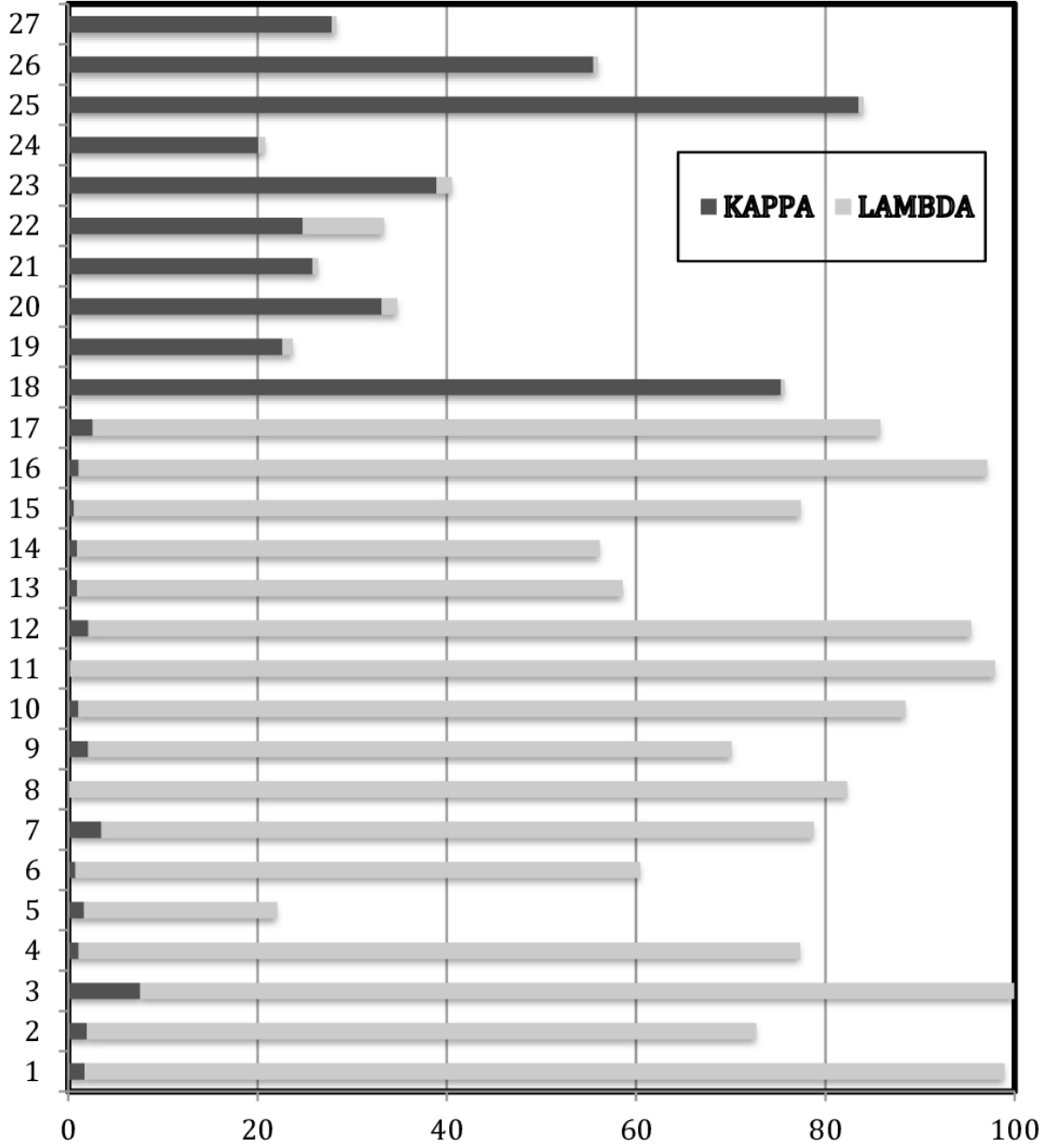
**Şekil 1:** KLL hücrelerinde hafif zincir ekspresyon paternleri;

**Figure 1:** Light chain expression patterns in CLL cells;

(A) Kappa klonite gösteren patern / (A) Pattern showing Kappa clone

(B) Lambda klonite gösteren patern / (B) Pattern showing lambda clonite

(C) Hafif zincir eksprese etmeyen patern. / (C) Pattern not expressing light chains.



**Şekil 2.** Kappa ve Lambda klonite gösteren KLL hücrelerinin hafif zincir ekspres etme yüzdeleri.  
**Figure 2.** Light chain expression percentages of CLL cells showing Kappa and Lambda clonites.

### TARTIŞMA

Olgun B hücreleri, adaptif immün sistem gereğince kappa ve lambda hafif zincirden birini içeren immünglobulin eksprese ederek klonal çeşitlilik gösterirler. Normal veya reaktif B hücrelerinin aksine, KLL hücreleri klonaldır, sadece tek bir immünglobulin türünü eksprese eder ve bu nedenle kappa

veya lambda hafif zinciri için monotipiktir. KLL hücreleri nadir de olsa biklonal ya da dual hafif zincir ekspresyonu gösterebilirler. Bu bulgular KLL tanısında önemli bir yere sahiptir.

Bu retrospektif çalışmada KLL vakalarında lambda restriksiyonuna (%51.5) kappa restriksiyonundan (%30.3) daha sık oranda

rastlanmıştır. Alves ve arkadaşları Brezilya'da 80 KLL hastada yaptıkları immunfenotipleme çalışmasında kappa hafif zincir restriksiyonun lambdadan daha sık rastlandığını (%57.9) göstermişlerdir (10). Pavia ve arkadaşları ise 43 KLL hastasının tümünde kappa/lambda oranını 10:1'den daha yüksek bulmuşlar ve %86'sının kappa hafif zincir, % 14'ünün de lambda hafif zincire sahip bir monoklonal B hücresi proliferasyonu olduğunu göstermişlerdir (11). Kappa hafif zincir restriksiyonunun daha fazla görüldüğü diğer bir çalışmada da tüm hastaların %54.5 nin kappa, %45.5 inin de lambda monoklonaliteye sahip olduğu gösterilmiştir (12). Literatürdeki bu verilerden farklı olarak hastalarımızda lambda hafif zincir restriksiyonunun daha fazla görülmesinin pek çok sebebi olabileceği gibi en önemli nedeni farklı ülke insanlarında yapılmış olmasıdır.

Çalışmamızda her iki hafif zinciri de eksprese etmeyen 6 vaka (%18.2) görülmüştür. Genellikle yüzey immünooglobulinleri eksprese etmeyen plazma hücre tümörleri ve prekürsör B hücresi akut lenfoblastik lösemisinin (ALL) aksine, B hücre malignitelerinde yüzey hafif zincirlerinin ekspresyonu eksikliği sık rastlanmayan bir durum olduğunu gösteren çalışmalar yanında (11-12) farklı olarak bizimle benzer sonuçlar gösteren çalışmalarda rastlanmaktadır. Bholra ve arkadaşları 42 KLL vakasında yaptıkları çalışmalarında 5 vakanın (%11.9) KLL hücrelerinde her iki hafif zincirin de eksprese etmediğini göstermişlerdir (13). Martini ve arkadaşları da 271 B hücreli non-Hodgkin lenfoma vakası üzerinde yaptıkları çalışmada yüzey

hafif zincir eksprese etmeyen 33 hasta olduğunu ortaya koymuşlardır (14).

KLL vakalarında görülen bir diğer patern KLL hücrelerinin biklonal karakterde olmasıdır. Bu patern oldukça nadir olup insidansı %0.7 ila %3.4 arasında değişmektedir (15-16). Hastalarımız arasında biklonal paterne rastlamadık. Hasta sayımızın az olması ve insidansın düşük olmasının buna neden olabilir. İnsidansın %3.4 olarak belirlendiği çalışmalardan birinin 5523 KLL vakasında (16) bir diğerinde de 353 KLL vakasında yapıldığı görülmektedir (17).

B hücre popülasyonunda hafif zincir restriksiyonunun gösterilmesi genellikle monoklonalitenin bir kanıtı olup malignitenin de bir göstergesi olarak kabul edilmekle beraber son dönemde yapılan çalışmalar her iki hafif zinciri birlikte eksprese eden (dual) B hücrelerin de malignite işareti olduğunu ortaya koymuştur (18). Literatürde dual hafif zincir eksprese eden KLL vakaları yer almakla beraber (9,19,20) insidans gösteren çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmadaki KLL hastaları arasında bu nadir görülen dual hafif zincir ekspresyonu görülmemiştir.

Akım sitometri analizinde monotipik bir B hücresi popülasyonunun saptanması her durumda bir B hücresi neoplazm göstergesi değildir. Klonal B hücreleri reaktif durumlarda ve monoklonal B hücreli lenfositozda da tespit edilebilir. Bu neden ile her ne kadar akım sitometri verileri KLL tanısında oldukça yardımcı olsa da daima morfoloji ve klinik özellikler ile birlikte yorumlanması gerekir.

## KAYNAKLAR

1. Wierda WG, Byrd JC, Abramson JS, Bilgrami SF, Bociek G, Brander D. Et al. Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 4.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. JNCCN 2020;18(2):185-217.
2. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. Blood 2008;111(12):5446-56.
3. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2015;26(Suppl 5):v78-84.
4. Leers MP, Theunissen PH, Ramaekers FC, Schutte B, Nap M. Clonality assessment of lymphoproliferative disorders by multiparameter flow cytometry of paraffin-embedded tissue: an additional diagnostic tool in surgical pathology. Hum Pathol 2000; 31(4): 422-7.

5. Levy R, Warnke R, Dorfman RF, Haimovich J. The Monoclonality of Human B cell Lymphomas. *Journal of Experimental Medicine* 1977;145:1014.
6. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol.* 2005;130(3):325-332.
7. Hsi ED, Hoeltge G, Tubbs RR. Biclonal Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am J Clin Pathol* 2000; 113:798-804.
8. Ghodke KA, Patkar NV, Subramanian PG, Gujral S, Kadam PA, Tembhare PR. Biclonal chronic lymphocytic leukemia: A study of two cases and review of literature. *Indian J Pathol Microbiol.* 2017;60(1): 84-6.
9. Dongsheng Xu. Dual Surface Immunoglobulin Light-Chain Expression in B-Cell Lymphoproliferative Disorders. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:853-856.
10. Alves G. VA, Silva L. KF, Albuquerque D. GB, Nascimento FF, Freitas RV, Silva D. GKC, Barbosa M.R, Cavalcanti G. B. Use of Flow Cytometry to Evaluate the Immunophenotypic Profile of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia from Rio Grande Do Norte State, Brazil. *Blood* 2017;130 (Sppl 1): 5325.
11. Paiva A.S, Jardim A.S, Soares V.L, Paiva HD. OP, Bahia FT, Sales V. SF et al. Diagnostic Value of Kappa/Lambda Ratios Determined By Flow Cytometric Analysis of Peripheral Blood and Bone Marrow Specimens in B-Cell Chronic Proliferative Disease. *Blood* 2018;132(Sppl 1): 5431.
12. Abdel-Ghafar AA, El Din El Tebany MA, Mahmoud HM, El-Sakhawy YN. Immunophenotyping of chronic B-cell neoplasms: flow cytometry versus immunohistochemistry. *Hematol Rep* 2012;4(1):e3.
13. Bhola RK, Das PK, Pradhan S, Chakraborty K, Mohapatra D, Samal P. et al. Multiplexing 8 colors with 12 antibodies in a single lymphoid screening tube by flow cytometry for evaluating suspected chronic lymphoproliferative disorders (CLPD). *J Hematopathol* 2020;13: 13–24.
14. de Martini RM, Turner RR, Boone DC, Lukes RJ, Parker JW. Lymphocyte immunophenotyping of B-cell lymphomas: a flow cytometric analysis of neoplastic and non-neoplastic cells in 271 cases. *Clin Immunol Immunopathol* 1988;49:365-379.
15. González-Campos J, Ríos-Herranz E, De Blas-Orlando JM, Martín-Noya A, Parody-Ruiz-Berdejo R, Rodríguez-Fernández JM. Chronic lymphocytic leukemia with two cellular populations: A biphenotypic or biclonal disease. *Ann Hematol* 1997;74:243-6.
16. Kern W, Bacher U, Schnittger S, Dicker F, Alpermann T, Haferlach T, et al. Flow cytometric identification of 76 patients with biclonal disease among 5523 patients with chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) and its genetic characterization. *Br J Haematol* 2014;164:565-9.
17. Sanchez ML, Almeida J, Gonzalez D, Gonzalez M, Garcia-Marcos MA, Balanzategui A. et al. Incidence and clinicobiologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone. *Blood* 2003;102(8):2994-3002.
18. Peltomäki P, Bianchi NO, Knuutila S, Teerenhovi L, Elonen E, Leskinen R, de la Chapelle A. Immunoglobulin kappa and lambda light chain dual genotype rearrangement in a patient with kappa-secreting B-CLL. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988;24(7):1233-8.
19. Schipper H, Orr KB, Bow EJ. Coexistence of double gammopathy (IgM  $\kappa$  and IgM  $\lambda$ ) in the serum of a single individual with chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 1983;69:23–31
20. Del Senno L, Gandini D, Gambari R, Lanza F, Tomasi P, Castoldi G. Monoclonal origin of B cells producing  $\kappa$ ,  $\lambda$  and  $\kappa : \lambda$  immunoglobulin light chains in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 1987;11:1093–1098.