

Plevral Effüzyonlarda Lenfosit Altgrupların Monoklonal Antikorlarla Değerlendirilmesi

Bio. Elif Ertenli *, Dr. Emin Kansu **, Dr. Gamze Mocan *, Bio. Hande Canpınar **

ÖZET

Monoklonal antikorlar ile işaretlenen lenfosit alt gruplarının plevral effüzyonlarda araştırılması seröz effüzyonların ayırıcı tanısında ve immünolojisinin anlaşılmasında önemli bilgiler sağlayabilir. Bu çalışma Ocak Ağustos 1994 tarihleri arasında yapılan bu çalışmaya 11 benign ve 15 malign hasta alınmıştır. Hastaların hepsinde klinik ve/veya patolojik kesin tanı konmuş olması şartı aranmıştır. Ayrıca 2 Burkitt lenfomalı hasta istatistiksel değerlendirmeye katılmadan incelenmiştir. Çalışmaya alınan hastaların hepsinde rutin biyokimyasal analizler ve hücre sayımlarına ek olarak monoklonal antikor teknolojisi ile lenfosit alt grupları çalışılmıştır. Sonuçta plevral effüzyonlarda hakim olan lenfosit tipinin T lenfositler ve özellikle CD+47 olan yardımcı T hücreleri olduğu, benign ve malign plevral effüzyonlarda lenfosit altgrupları bakımından fark olmadığı ve seröz effüzyonlarda yüksek oranda B lenfosit bulunmasının B hücre kökenli neoplazm varlığını akla getirmesi gerektiği görüşüne varılmıştır.

Anahtar kelimeler : Plevral effüzyon, T Lenfosit

GİRİŞ

Çeşitli nedenlerle ortaya çıkan seröz effüzyonların ayırıcı tanısında bu sıvıların biyokimyasal özellikleri, adenin deaminaz (ADA) gibi bazı enzimler ve içerdikleri hücre tiplerinin belirlenmesi günümüzde klinik ve radyolojik bilgilere ek olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin birlikte kullanılmasına rağmen özellikle benign ve malign effüzyonların ayırımının yapılması halen bir sorun oluşturmaktadır. Effüzyonların içerdiği hücrelerin sitopatolojik olarak incelenmesi değerli veriler sağlamakta birlikte bazen yeterli olmamaktadır. Seröz effüzyonlarda klasik morfolojik kriterlere göre reaktif mezotelyal hücreler ile, neoplastik hücrelerin ayırdedilmesi önemli bir sorundur. Ayırıcı uygulanan farklı tedaviler ile meydana gelen sitolojik değişiklikler tam bir sitolojik kriter sağlayamadığından tanıyı zorlaştırmaktadır.

Son on yılda geliştirilen monoklonal antikor teknolojisi ile insan lenfositlerinin yüzey işaretleri belirlenmiş, bu doğrultuda T ve B lenfositlerinin yüzey antijen özellikleri tanımlanmıştır.¹ Bu

SUMMARY

Between January, 1994 and August, 1994 total 28 patient's pleural effusions were studied. all samples were evaluated by routine biochemical and cytological examinations. Additionally, using monoclonal antibodies lymphocyte subtypes were studied. Eleven patients had benign etiologies, 15 had malign etiologies. Two patients Burkitt's lymphoma were also studied but these two patients were not included in statistical analysis. As a result we conclude that T lymphocytes, especially CD4+ T lymphocytes are the main effector cell type in both benign and malign pleural effusions. Low levels of B lymphocytes is another characteristic finding. Presence of high levels of B lymphocytes in pleural fluids may be seen in B cell neoplasm such as Burkitt's lymphoma.

Key words : Plevral, effusion, T lymphocyte.

çalışmalarla T ve B lenfosit alt gruplarının değerlendirilmesine monoklonal antikor (MoAb) tekniği ile neoplastik ve normal hücrelerin ayrılması kolaylaşmıştır. Yine monoklonal antikorlar ile karsinom hücrelerindeki karsinoembriyonik antijen gibi bazı antijenik determinantlar belirlenmiş ve tümör hücrelerinin ayırıcı tanısında önemli yer almıştır.²

Önceden yapılan ve lenfosit alt gruplarının plevral effüzyonlarda dağılımını inceleyen araştırmalarda Moisan ve arkadaşları 12'si malign olmak üzere 27 hasta incelemişler ve malignansiye bağlı plevral effüzyonlarla tbc veya kollajen doku hastalığı gibi spesifik nedene bağlı effüzyonlarda T lenfositlerin plevral sıvıda kana göre daha yüksek oranda bulunduğunu göstermişlerdir.³ Başka araştırmalarda da tüberküloza bağlı plevral effüzyonlarda kandaki oranlara göre plevral sıvı T lenfositlerinde artma, B lenfositlerinde azalma olduğu gösterilmiş ve bu artmış T lenfositleri nedeniyle T hücre bağımlı hücrel immün cevabın tbc'de lokal patolojide önemli rol oynayabileceği ileri sürülmüştür.⁴ Bu çalışmada, benign ve malign seröz effüzyonlarda lenfosit altgruplarının monoklonal antikorlarla belirlenerek effüzyon tiplerinin ayırımındaki önemi ve kullanılan diğer biyokimyasal parametrelerle ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Sitoloji Ünitesi

** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Anabilim Dalı

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya yaşları 28 ile 55 arasında değişen ortalama yaşı 43.0 9.3 olan 11 benign effüzyonu olan hasta ve yaşları 41 - 65 arasında değişen ortalama yaşı 50.6 6.7 olan 15 malign hasta alınmıştır. Benign grupta yedi tüberküloz, iki Sistemik Lupus Eritematosus (SLE), bir pankreatit ve bir romatizmal kalp hastalığı (RKH) bulunmaktadır. Onbeş malign hastadan dokuzu akciğer kanseri, beşi meme kanseri, biri hepatosellüler karsinom olarak kesin tanı almış hastalardır. Ayrıca, Burkitt lenfoma tanısı konulan iki hastadan alınan torasentez sıvısı da çalışıldı, ancak bu hastaların değerleri ortalama hesaplarına dahil edilmedi. Toplam olarak 28 hastanın plevral ve peritoneal sıvı örnekleri çalışıldı.

Hastaların hepsinin klinik ve/veya patolojik olarak kesin tanıları mevcuttur. Bütün hastaların sıvı örneklerinde ve kanlarında glukoz, total, protein, LDH değerleri çalışılmıştır. Tüberküloz tanısı almış olan 7 hastanın 5'inde adenin deaminaz (ADA) enzim düzeyleri çalışılmış, iki hastada ise ADA bakılmamıştır. Tüm sıvılarda mikrobiyolojik inceleme yapılmıştır. Tüberküloz şüphesi olan hastalarda direk mikroskopik inceleme ile aside rezistan basil (ARB) taraması yapılmış ve iki hastada kobay inokülasyonu uygulanmıştır.

Bu hastaların sıvı örneklerinde monoklonal antikor ile lenfosit alt grupları çalışılmıştır. Sıvı örnekleri alındıktan sonra hemen çalışmaya alınmıştır.

Lenfosit tiplendirmesinde kullanılan antikorlar, Pan - T monoklonal antikor (Dako- CD3, UCT T1 Denmark), Yardımcı T hücre monoklonal antikor (BMA 040 Behringwerke A 6, W Germany), Baskılayıcı / sitotoksik T hücre monoklonal antikor (BMA Behringwerke AG, W. Germany). B lenfositlerinin değerlendirilmesinde (FITC - anti insan Ig (G+A+M) Behring, Germany). kullanılmıştır. CD4, CD8 indirekt monoklonal antikorları kullanıldığı için FITC işaretli anti-fare (GAM FITC Coulter clone) eklenmiştir. Hücre süspansiyonları ml'de 1x10⁶ olacak şekilde immünofloresan veren hücrelerin sayıları belirlenip yüzde olarak ifade edilmiştir. Gruplardaki parametrelerin değerlendirilmesinde Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Benign ve malign grup yaş ortalamaları farklı bulunduğu için tüm parametrelerin yaşla korelasyonu olup olmadığı Spearman korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Bu çalışmada lenfositik plevral effüzyonu olan 25 hasta (15 malign, 11 benign) ve malign asiti olan 1 hasta olmak üzere toplam 26 hasta incelendi. Burkitt lenfomalı iki hastanın plevral effüzyonları da ayrıca çalışıldı. Bu iki hasta istatistiklere dahil edilmedi. Benign ve malign gruplardaki hastaların özellikleri aşağıda gösterilmiştir.

	Hasta Sayısı	Yaş (ortalama±SD)	Cins (K/E)
Benign Grup	11	43.0±9.3*	5/6
Malign Grup	15	50.6±6.7	6/9
*p = 0.045			

Tablo 6 : Gruplardaki Genel Özellikler

Gruplarda yaş ortalamaları arasında fark gözlenmesi nedeniyle tüm parametrelerin yaşla korelasyonuna Spearman korelasyon analizi testi ile bakıldı ve çalışan parametrelerin hiçbirinin yaşla korelasyonu olmadığı görüldü. Benign ve malign gruplarda fark yoktu (Tablo 1)

Hücreler	Benign Grup (n=11)	Malign Grup (n=15)	P
Beyaz küre/mm ³	7909±4273*	7173±3720	0.7
%PMN	10.1±11.8	17.2±13.5	0.1
Mutlak PMN/mm ³	722±1049	1320±1471	0.2
% Lenfosit	88.8±11.7	80.9±14.7	0.1
Mutlak lenfosit/mm ³	7140±	5760±3049	0.4
*Ortalama±SS			

Tablo 1 : Hasta Gruplarında Hücre Sayımlarının Karşılaştırılması

Monoklonal antikorlar ile işaretlenerek sayılan lenfosit alt gruplarının karşılaştırılmasında da hem yüzde hem de mutlak değer olarak iki grup arasında fark bulunmadığı gözlemlendi. (Tablo-2)

Hücreler	Benign Grup (n=11)	Malign Grup (n=15)	P
% CD3	63.2±8.8*	61.8±11.2	0.8
Mutlak CD3/mm ³	4372±2397	3556±2007	0.4
% CD4	46.0±11.2	49.5±12.3	0.7
Mutlak CD4/mm ³	3113±1703	2850±1778	0.5
%CD8	21.3±6.1	18.8±7.2	0.4
Mutlak CD8/mm ³	1531±1135	1076±598	0.4
% B	6.4±2.6	8.4±3.9	0.5
Mutlak B/mm ³	431±245	446±274	0.7
*Ortalama±SS			

Tablo 2 : Benign ve Malign Grupta Lenfosit Altıplarının Karşılaştırılması.

Gruplarda lenfosit altıplarının dağılımı incelendiğinde benign grupta %46, malign grupta % 49.5'luk ortalama ile her iki grupta da hakim olan hücre tipinin CD4+ T lenfositler olduğu görüldü. CD8+ T lenfositler benign grupta % 21.3, malign grupta % 18.8 oranında bulunmaktaydı. B lenfositler ise benign grupta % 6.4, malign grupta % 8.4 gibi düşük oranda saptandı.

Onsekiz ve 54 yaşlarında iki erkek Burkitt lenfomalı hastanın plevral sıvıları ayrı olarak değerlendirildi. Bu hastaların ikisinde de plevral sıvıda % 100 oranında lenfosit mevcuttu. Lenfosit altıplarına bakıldığında sırası ile CD3 % 16 ve %3, CD4 %14 ve %4, CD8% 1 ve % 1, B lenfositler ise % 69 ve % 78 oranında tespit edildi.

TARTIŞMA

Günümüzde pek çok hastalığın oluşma mekanizması halen anlaşılabilmemiş değildir. Son on yılda gelişen monoklonal antikor teknolojisi ile pek çok hücre yüzey antijenlerinin belirlenmesi

mümkün olmuş ve immünoloji, hematoloji, onkoloji ve diğer biyolojik bilimlerde yeni bir uygulama alanı oluşturmıştır. Hücre yüzey işaretlerine dayanarak lenfositlerin alt gruplara ayrılması, gelişim evrelerin belirlenmesi hem doğal olarak meydana gelen değişikliklerin anlaşılmasını, hem de hastalık durumlarında hastalığa neden olan hücrelerin ve mekanizmaların ortaya çıkarılmasını sağlamıştır. Bugün bazı hematolojik malignansilerin köken aldığı hücrelerin MoAb ile belirlenmesi hastalığın tanı ve tedavisi yönünden yol gösterici olmaktadır.⁵ Monoklonal antikor teknolojisi ile spesifik olarak işaretlenebilen hücre yüzey antijenleri ile lenfosit alt gruplarının tayini, bu hücrelerin immün regülasyondaki rollerinin ortaya çıkarılması ve aktivasyon derecelerinin belirlenmesi mümkün olmuştur.⁶ T hücreleri ve B hücreleri arasında kompleks etkileşimler olmasına rağmen temel olarak T hücreleri immüniteyi, B hücreleri ise humoral immüniteyi sağlar. T hücreler immün cevabı başlatır, antijen spesifik efektör cevabı regüle eder ve sitokinleri salgılayan hücrelerin aktivitesini düzenler.⁷

Bizim çalışmamızda araştırma grubunu oluşturan hastaların plevral effüzyonlarının özellikleri incelendiğinde malign grupta bulunan 15 hastanın hepsinde plevral sıvının eksuda niteliğinde bulunduğu, benign, grupta ise yalnız iki hastada transuda niteliğinde plevral sıvı saptandığı ve diğer 9 hastada plevral sıvının yine eksudatif olduğu görülmektedir. Plevral sıvıların transuda/eksuda olarak ayrımı konjestif kalp yetmezliği gibi transuda niteliğinde plevral sıvı oluşumuna yol açan bazı hastalıklar hakkında ipucu vermekle beraber benign/malign ayrımını yapmakta yeterli değildir. Yine hasta gruplarında total beyaz küre, polimorfonükleer lökosit, lenfosit sayımları karşılaştırıldığında iki grup arasında fark olmadığı gözlenmektedir. Bu gelenekselleşmiş yöntemler bazı hastalıklar hakkında bilgi sağlanmasına karşın seröz effüzyonların benign/malign olarak sınıflandırılmasını sağlayamamaktadır.⁸ Bu nedenle seröz effüzyonların güvenilir bir şekilde ayrımını sağlayacak çalışmalar günümüzde de yoğun bir şekilde sürdürülmektedir. Lenfosit alt gruplarının incelenmesi de teorik olarak ek bilgiler sağlayabilecek bir yöntem olarak düşünülebilir. Öte yandan değişik etkenlerle ortaya çıkan plevral effüzyonlardaki lenfosit alt gruplarının incelenmesi doğal immünitenin değişik etkenlere karşı cevabının anlaşılması yönünden de değerli bilgiler sağlayabilir.

Literatürde plevral effüzyonlarda lenfosit alt gruplarını inceleyen çeşitli çalışmalarda genellikle benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bergroth ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada tbc plevral effüzyonlarında T4/T8 oranı 2:1 gibi bulunmakla beraber her iki hücre grubundaki hücrelerin büyük çoğunluğunun aktivasyon belirleyicileri taşımadığı, yalnız küçük bir kısım T4 ve T 8 hücrelerini aktif durumda oldukları gösterilmiştir.⁹ Kan ve plevral sıvıdaki lenfosit oranlarını

karşılaştıran çalışmalarda tbc ve primer akciğer karsinomunda plevral sıvıda CD3+ lenfositlerde artma ve beraberinde B lenfositlerde azalma olduğu ileri sürülmüştür.¹⁰ Tüberküloza bağlı plevral effüzyonlarda T lenfositlerdeki artışın esas olarak CD4+ alt grubundan kaynaklandığı ve CD4+/CD8+ oranını arttırdığı gösterilmiştir.¹¹ Primer akciğer karsinomunda da benzer özelliklerin görülebildiği bildirilmiştir.¹² Albera ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise tbc'da malignansi ve konjestif kalp yetmezlikli hastalara göre plevra sıvısında daha fazla lenfosit bulunduğu ileri sürülmüştür.¹³ Bu araştırmacılar ayrıca tbc'a bağlı plevral effüzyonlarda malignansi ve kalp yetmezliğine göre CD4+ ve CD3+ hücrelerinde artma, CD8+ hücrelerde ise azalma olduğunu gözlemişlerdir. Yine bu çalışmada malignansinin histolojik tipine göre farklı lenfosit hakimiyetini gösteren bu çalışmaların yanında kronik lenfositik lösemiye bağlı gelişen bir plevral effüzyonda B lenfosit hakimiyeti olduğu bildirilmiştir.¹⁴ Domagala ve arkadaşları tarafından yapılan ve tbc ile küçük hücreli lenfoma ve kronik lenfositik lösemili hastaların plevral effüzyonların karşılaştırılmasının yapıldığı bir çalışmada da tbc'de %80 T lenfosit, lösemi/lenfoma grubunda ise % 83 B lenfosit varlığı saptanmış ve bu sonuç B hücrelerinden köken alan lenforetiküler neoplazmların tanısında değerli bulunmuştur.¹⁵

Bizim çalışmamızda lenfositik plevral effüzyonu olan hastalarda yaklaşık % 60 oranıyla CD3+ lenfositlerin hakim olduğu, CD4+ ve CD8+ lenfositlerin 2:1 (%40, %20) oranında bulunduğu ve B lenfositlerin ancak % 6 gibi düşük bir oranda bulunduğu görülmektedir. Benign ve malign hasta grupları karşılaştırıldığında sırasıyla: CD3+ lenfositler % 63 ve % 62, CD4+ lenfositler % 46 ve %49, CD8+ lenfositler % 21 ve %19, B lenfositler ise % 6 ve % 8 oranında görülmektedir ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Görüldüğü gibi her iki grupta da CD3+ ve CD4+ lenfositler ana hücre grubunu oluşturmaktadır. Bu bulgular plevral effüzyonlarda reaksiyon veren hücrelerin T lenfositler ve özellikle yardımcı T lenfositler olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızdaki bulgular, lenfosit alt gruplarının benign emalign effüzyonların ayırıcı tanısında kesin bir belirleyici olmadığına işaret etmektedir. Ancak istatistik değerlendirmeye alınmayan iki Burkitt lenfomalı hastanın sonuçları incelendiğinde diğer plevral effüzyonlarda %5-6 gibi düşük oranlarda bulunan B lenfositlerin % 90'ın üzerinde olduğu görülmektedir. Bu grupta yalnız iki hasta yer aldığı için sonuçlar diğer gruplarla karşılaştırılmamıştır. Bu bulgu literatür bilgileri ile birlikte değerlendirildiğinde benign ve malign hastalık sonucu gelişen plevral effüzyonlarda hakim olan hücre grubunun T lenfositler olduğu, Burkitt lenfoma gibi B hücre kökenli olgularda ise plevral sıvıda %90 oranında B lenfositlerin bulunduğu ve bu bulgunun B hücre kökenli neoplazmların tanısında önemli olabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Johnson G.R., Moore M.A.S., Role of stem cell migration in initiation of mouse fetal liver haemopoiesis. *Nature*. 1975; 258: 726-728
2. McKenna J.M., Chandrasekhar A.J., Henkin R.E., Diagnostic value of carcinoembryonik antigen in exudative pleural effusions. *Chest*. 1980; 78: 587-5980.
3. Moisan T., Chandrasekhar A.J., Robinson J. et al., Distribution of lymphocyte subpopulations in patients with exudative pleural effusions. *Am Rev Respir Dis*. 1978; 117: 507-511.
4. Lucivero G., Pierucci G., Bonomo L., Lymphocyte subsets in peripheral blood and pleural fluid. *Euro Respir J*. 1988; 1: 337-339.
5. Bach J.F., Fracchia G.N., Chatenoud L., Safety and efficacy of therapeutic monoclonal antibodies in clinical therapy. *Immunol Today*. 1993; 9: 421-424.
6. Haynes B.F., Human T lymphocyte antigens as defined by monoclonal antibodies. *Immunol Rev*. 1981; 57: 127-162.
7. Roit I., Brostoff J., Male D. (editors), *Immunology* 3rd Edition, Mosby Year Book Europe Limited, London. Development of immun system. 1990 11;111.16,
8. Berkman N., Kramer M.R., Diagnostic tests in pleural effusion-an update *Postgrad Med J*. 1993; 69: 12-18.
9. Bergroth V., Konttinen T., Nordström D. et al., Lymphocyte subpopulations, Activation phenotypes, and spontaneous proliferation in tuberculous pleural effusions. *Chest*. 1987; 3: 338-341.
10. Petterson T., Klockars M., Hellström P.E. et al., T and B lymphocytes in pleural effusions. *Chest*. 1978; 73: 49-51.
11. Gosh A.K., Spriggs A.I., Mason D.Y., Immunocytochemical staining of T and B lymphocytes in serous effusions. *J Clin Pathol*. 1985; 38: 608-612.
12. Gans L.C., Miller L.G., Goldenheim P.D. et al., Alterations in immunoregulatory cells in lung cancer and smoking. *J Clin Immunol*. 1982; 2: 90-94.
13. Albera C., Mabritto I., Ghio P. et al., Lymphocyte subpopulations analysis in pleural fluid and peripheral blood in patients with lymphocytic pleural effusions. *Respiration*. 58: 1991; 65-71.
14. Boccato P., Saran B., Pasini L. et al., Immunology of lymphocytes in pleurisy and in effusions due to pleural infiltration by chronic lymphocytic leukemia cells *Acta Cytologica* 1978; 22: 284-285.
15. Domagala W., Emeson E.E., Koss L.G., T and B lymphocyte enumeration in the diagnosis of lymphocyte-rich pleural fluids. *Acta Cytologica*. 1981; 2: 108-110.