

Deneyisel BCG Uygulanımında Akciğer ve Karaciğerde Ortaya Çıkan Histopatolojik Değişiklikler ve Bunların TNF- ∞ İle İlişkisi*

Dr. Reyhan EĞİLMEZ**, Dr. Handan AKER***

ÖZET

BCG verilen kemelerde endotoksinin uygulanması ile aktive makrofajlardan TNF- ∞ (tümör nekroz faktörü) salınımı olur. TNF- ∞ 'nin akut sistemik salınması septik şok ve doku zedelenmesine neden olurken, daha az miktarlar normal dokunun yeniden şekillenmesi ile patojenlere karşı konağın direncini artırır. Bu çalışmada BCG uygulanan farelerin akciğer ve karaciğerdeki histopatolojik değişiklikleri araştırıldı. Deney ve kontrol grupları arasında granülom oluşumu, yağlı değişiklik, fokal nekroz ve glikojen miktarında azalma bakımından farklılıklar tesbit edildi. Sonuç olarak granülom dışındaki değişikliklerin direkt BCG'ye bağlı olmayıp muhtemelen salınan bir sitokin (özellikle TNF- ∞) aracılığı ile geliştiği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler : BCG, TNF- ∞ , fareler

GİRİŞ

Tüberküloz profilaksisi ve nonspesifik aktif immünoterapide kullanılan BCG; lipopolisakkarit (LPS), parazitler, viral partiküller, bakteriler ve bazı bakteri enterotoksinleri aktive makrofajlar ve lenfositlerden TNF- ∞ salınımı artırır (1-7). TNF- ∞ düşük dozlarda yangısal reaksiyon ve yara iyileşmesi ile dokunun yeniden şekillenmesinde fizyolojik rol oynadığı halde, enfeksiyon sırasında aşırı salınımı halinde letal doku zedelenmesi ve şoka neden olur (1).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda adjuvan olarak kullanılan BCG enjeksiyonu sonrasında LPS verilerek, serumda yüksek TNF- ∞ düzeyleri saptanmış ve visseral organlarda meydana gelen histopatolojik değişikliklerden TNF- ∞ sorumlu tutulmuştur (1,5, 8-10). Bu çalışmada, TNF- ∞ 'nin salınımının sadece BCG vererek uyanıp uyanmadığı ve eğer uyanılıyorsa bunu BCG dozları ile ilişkisinin olup olmadığını saptamak ve nadir de olsa BCG'nin hem tüberküloz profilaksisi, hem de nonspesifik aktif immünoterapide görülen yan etkilerinin TNF- ∞ ile ilişkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla albino farelere deneyel olarak değişik dozlarda BCG verilerek akciğer ve karaciğerde meydana gelen histopatolojik değişiklikler

SUMMARY

The experiments showed that TNF- ∞ (tumor necrosis factor) derived from activated macrophages might participate in the endotoxin in BCG sensitized rats. Acute systemic release of TNF- ∞ causes septic shock and tissue injury, but the lesser amounts in tissues causes the beneficial effects may predominate enhance host defence against pathogens and to help normal tissue remodelling. In this experiment we studied the histopathological changes resulted in the liver and in the lung due to BCG administration on the mice. There were some differences between experimental and control groups such as granuloma formation, fatty change, focal necrosis and decrease glycogen amounts.

Our results suggested that the changes other than the granulomas are not resulted by the BCG but more likely by the possible mechanism of cytokine (especially TNF- ∞) release.

Key Words : BCG, TNF- ∞ , mice.

araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada ağırlıkları 45-50 g arasında değişen albino tipi fareler kullanıldı. Fareler rastgele 5 gruba ayrılarak kontrol grubuna 0.05 ml serum fizyolojik, A grubuna 0.05 ml, B grubuna 0.01 ml, C grubuna 0.2 ml, D grubuna 0.4 ml BCG steril tüberkülin enjektörü ile intraperitoneal olarak verildi. Her grupta toplam 10'ar fare olmak üzere çalışmada toplam 50 fare kullanıldı. Tüm farelerde gözlem süresi 6 hafta olarak belirlendi. Gözlem süresi içinde ölen 8 farenin 6 tanesine hemen otopsi yapıldı. İki farenin kafesteki diğer fareler tarafından parçalanması nedeniyle değerlendirme yapılamadı. Diğer fareler gözlem süresi sonunda servikal dislokasyonla öldürülerek otopsileri yapıldı.

Farelerin akciğer ve karaciğerleri makroskopik olarak incelendi. İncelenen bu dokular % 99.5'luk etil alkolle tesbit edildi. Akciğer dokularından hazırlanan parafin bloklarından 5µ kalınlığında ince kesitler Hematoksilen-Eozin (HE), Ziehl -

* Bu çalışma XI. Ulusal Patoloji Kongresinde bildirisi olarak sunulmuştur.

** Yard. Doç. Dr. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

*** Prof. Dr. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

Neelson boyaları ile boyanarak,; karaciğerden hazırlanan parafin bloklardan hazırlanan kesitler HE, PAS, Gomori'nin retikulum ve Ziehl-Neelson boyaları ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

Elde edilen sonuçlara "Kruskal-Wallis varyan analizi" ve "iki yüzde arasındaki farkın önemlilik testi" uygulanarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Gözlem süresince A grubundan bir, B grubundan üç, C grubundan iki ve D grubundan iki fare olmak üzere toplam sekiz fare öldü. Deney grupları ile kontrol grubu arasındaki mortalite oranı karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p>0.05$).

BCG'nin albino farelerin akciğer ve karaciğer dokuları üzerindeki etkileri iki ana grupta toplandı.

A) BCG'ye bağlı direkt etkiler;

Gözlem süresi içinde ölen B grubundan 2(%20), C grubundan 1 (%11.), D grubundan 1(11.1) farenin akciğerinde, hiperamik damarlar, bazı alveol boşlukları ve interalveoler septalar içinde PMNL'ler ve 'seyrek lenfositlerin yer aldığı akut yangısal reaksiyonlar izlendi.

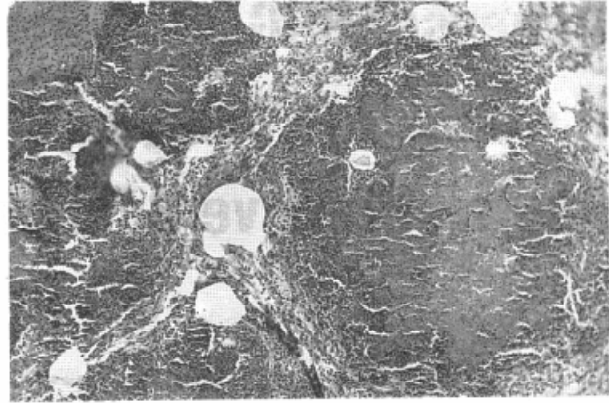
Gözlemin 16. günü ölen A grubundan bir farenin akciğerinde makroskopik olarak 1-2 mm çapında beyaz-sarı renkli lezyonlar izlendi. Histopatolojik incelemede ise, santralde geniş kazeifikasyon nekrozu bulunan çok sayıda birbirleriyle kaynaşmış tüberkülomların bazılarında Langhans tipi dev hücre ve lenfositler görüldü (Resim 1). Ziehl-neelson boyası ile ARB (Aside Rezistan Basil) görülmedi.

C gurubundan gözlemin onsekizinci günü ölen farede ise epitelooid histiositlerin oluşturduğu nekrozu olmayan granülom izlendi.

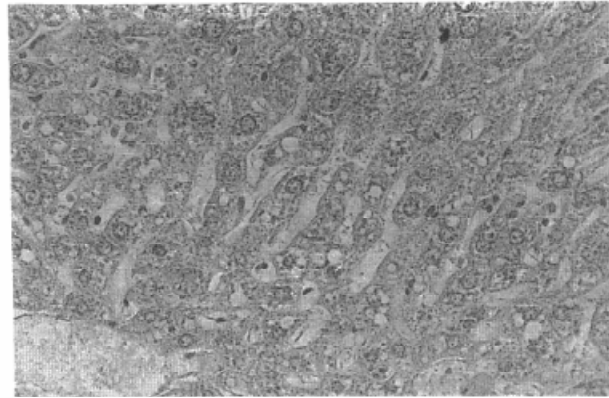
Granülom görülme oranı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p>0.05$).

B) BCG'nin bilinen etkileri dışında ortaya çıkan indirekt histopatolojik değişiklikler;

BCG'nin değişik dozlarla verilmesiyle karaciğerde meydana gelen histopatolojik değişikliklerden kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılığın anlamlı bulunduğu vakuoler dejenerasyon, hepatositlerin glikojen içeriğinde azalma, nükleer pleomorfizm, fokal nekroz ve ilişkili bulunan yağlanma esas



Resim 1 : Santralde kazeifikasyon nekrozu içeren tüberkülomlar (HEX40)



Resim 2 : İntrasitoplazmik mikroveziküler yağlı dejenerasyon gösteren hepatositlerin yer aldığı karaciğer dokusu (HEX100).

olarak değerlendirildi. Karaciğerde görülen bu değişiklikler Tablo I'de gösterilmiştir.

Vakuoler dejenerasyonun hepsi gözlem süresi sonunda öldürülen farelerde izlendi. Kontrol grubunda ve A grubundaki hiç bir farede görülmez iken, B grubundaki 4 (%40), D grubunda ise 1 (%11.2) farede histopatolojik bir bulgu olarak karşımıza çıktı.

Yağlanma, kontrol grubunda 3 (%30) farede izlenirken, A ve

	KONTROL		A		B		C		D	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Bulanık şişme	10	100.0	10	100.0	10	100.0	10	100.0	9	100.0
Vakuoler dejenerasyon	1	10.	-	0.0	4	4.45	4	40.0	1	11.2
Yağlanma	3	30.0	1	10.0	-	0.0	-	0.0	1	11.2
Glikojende azalma	-	0.0	3	30.0	4	4.45	3	30.0	2	22.3
Nükleer pleomorfizm	10	100.0	10	100.0	9	100.0	10	100.0	9	100.0
Fokal nekroz	10	100.0	10	100.0	8	88.9	10	100.0	9	100.0
Granülom	-	0.0	1	10.0	-	0.0	1	12.2	-	0.0

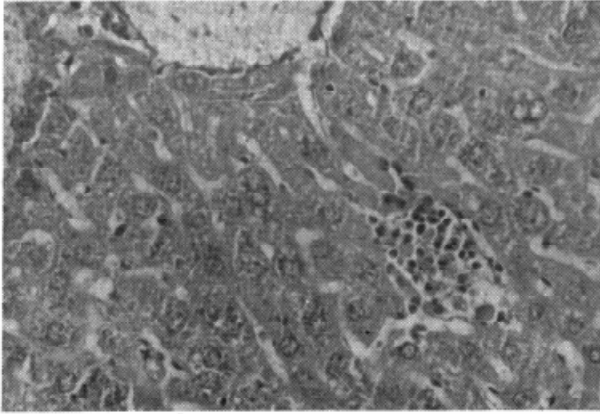
Tablo I : Kontrol ve değişik dozlarda BCG uygulanan farelerde karaciğer parankiminde görülen histopatolojik değişikliklerin dağılımı

D grubunda birer farede saptandı (Resim 2). B ve C grubunda hiç bir farede yağlanma görülmedi.

Hepatositlerin glikojen içeriğinde azalma, kontrol grubunda hiç bir farede dikkati çekmedi. buna karşın A grubunda 3 (%30) (bir tanesi gözlem süresi içinde öldü), B grubunda 4 (%44.5) (iki tanesi gözlem süresi içinde öldü), C grubunda 3 (%30) (iki tanesi gözlem süresi içinde öldü), D grubunda da 2 (%2.12) farenin hepatositlerinde glikojen içeriğinde azalma saptandı.

Hafif nükleer pleomorfizm kontrol ve deney gruplarını oluşturan farelerin tümünde saptanan bir bulgu olmasına karşın belirgin formu A grubunda 2 (%20), B grubunda 4 (44.5), C grubunda 4 (%40) ve D grubunda 1 (11.2) farede izlendi. Kontrol grubunu oluşturan farelerin hiçbirinde ise belirgin nükleer pleomorfizm görülmedi.

Fokal nekroz görülme oranları, arasındaki farklılık yönünden kontrol grubu ile deney grupları arasında anlamlı bir sonuç elde edilmedi. Ancak, nekroz odaklarının lokalizasyonu yönünden önemli farklılıklar dikkati çekti. Kontrol grubunda belirgin bir zonal patern göstermeyen fokal nekroz alanları deney gruplarında, özellikle Z2 (midzonal) de yoğunlaştığı belirlendi (Resim 3).



Resim 3 : Kaldırım taşı manzarası gösteren hepatositlerde bulanık şişme ve lenfositler seyrek PNML'lerin yer aldığı fokal nekroz odağı (H.Ex100)

TARTIŞMA

TNF- α 'nın BCG+LPS uygulanmasından sonra salgılandığının saptanması ve TNF- α 'nın değişen dozlarda değişik etkilerin in vitro olarak gösterilmesi nedeniyle, bu çalışmada BCG'nin farklı dozlardaki etkileri ve bu etkilerin TNF- α ile ilgisi bulunup bulunmadığı araştırıldı. Bu etkiler iki aşamada değerlendirildi. Öncelikle BCG'nin farelerin akciğer ve karaciğerleri üzerindeki enfeksiyöz ya da nonenfeksiyöz etkileri, daha sonra da elde edilen veya ortaya çıkmayan bulguların TNF- α ilişkisi incelendi.

BCG'nin etkisi önce morfolojik olarak tüberkümların varlığı ile takip edildi. Tüberkümlar A ve C gruplarında birbirinden farklı 4 farede (2'si akciğer ve 2'si karaciğerde) izlendi. Kobay veya tavşanlarda yapılan deneylerde M. bovis'in IV verilmesinde 2-3 hafta sonra tüberkümlar oluştuğu ve bu sürenin öncesinde de nonspesifik reaksiyonların oluştuğu gösterilmiştir.

(11,12).

Gözlem süresi içinde ölen farelerin B grubunda 2, D grubunda 1 farenin akciğerinde alveol içinde ve intaraalveolar septadaki PMNL infiltrasyonu erken reaksiyonlar olarak yorumlandı. Farelerden birinin akciğerinde kazeifiye, birinin akciğerinde ve iki ayrı farenin karaciğerindeki nonkazeifiye granülomları basilin direkt IP yolla kana karışması yanısıra hipersensitivite sonucunda oluştuğunu düşünüyoruz.

Karaciğerde saptanan vakuoler dejenerasyon, yağlı dejenerasyon, glikojen içeriğinde azalma, fokal nekroz ve nükleer pleomorfizm gibi histopatolojik değişikliklerin görülmesi direkt basilin etkisiyle açıklanamamaktadır. Burada mediatör rol oynadığı düşünülen TNF- α 'nın karaciğerdeki bu değişikliklerden sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Yağlı dejenerasyon, deney gruplarından A ve D grubunda birer farede saptanırken, kontrol grubunda 3 farede izlendi. Artan BCG dozları ile ilişkisi saptanmayan bu yağlı dejenerasyonun, BCG verilmesi ile uyarılan ve yağlanmayı engelleyici mediatör rol oynayan bir madde aracılığıyla gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. Burada mediatör rol oynayan TNF- α sorumlu tutulabilir.

Tracey ve arkadaşları TNF- α 'nın yağlanmayı lipolizisi artırarak engellediğini, Beutler ve Cerami ise TNF- α 'nın sistemik lipoprotein lipaz aktivitesini azaltarak yağ asitlerini hücre içine alınmasını inhibe ettiğini ve bu nedenle yağlanmanın azaldığını ileri sürmektedirler (1,2).

A, B ve C gruplarında izlenen glikojen içeriğindeki azalma TNF- α 'nın glikojenolizisi artırması yoluyla gerçekleştirdiği kabul edilebilir. İn vitro çalışmalar ile TNF- α 'nın glikojenolizisi arttırdığı gösterilmiştir (1,2). Ayrıca, A ve C grubundaki farelerde olaya tüberkümların eşlik etmesi yangısal reaksiyonlarda TNF- α 'nın mediatör rolünü de yansıtmaktadır. Yangısal reaksiyonlarda TNF- α ve IL-1 aracılığıyla bir yandan endotel yüzeyine lenfosit ve PMNL'lerin adnezyonunun artırılması, diğer yandan prokoagülan aktiviteyi artırması ve ayrıca, endotel hücrelerinde PG sentezini uyararak iskemik zedelenmeye yol açtığı bilinmektedir (1-4,11).

Deney gruplarında izlenen belirgin pleomorfizmin yine hücre zedelenmesine neden olan bir mediatör aracılığıyla meydana geldiğini düşündürmektedir.

Deney gruplarında daha çok Z2'de meydana gelen fokal nekrozlarda iskemik zedelenmeden farklı bir mekanizmanın olabileceğini düşündürmektedir. Deneylerde TNF- α ve IL-1'in prokoagülan aktiviteyi artırdığı, antikoagülan aktiviteyi de azalttığı gösterilmiştir (1-4). Bu olay karaciğerde fibrin depolanması ve trombosit toplulukları ile sinuzoidlerde mikrotrombüslerin oluşumuna neden olur. Bu şekilde mikrosirkülasyonda meydana gelen bu bozukluk kendini öncelikle Z2'de daha sonra diğer zonlarda nekroz şeklinde gösterir (10,13). TNF- α ve IL-1 aracılığıyla meydana gelen iskemik doku zedelenmesi sonucunda Z2'de fokal nekrozların daha fazla olması beklenirdi. Ancak, burada bazı araştırmacıların belirttiği gibi özellikle mikrosirkülasyon bozukluğu nedeniyle meydana gelen nekrozların Z2'de bulunması ve daha sonra diğer alanlarda bulunması dikkat çekicidir. Deney gruplarında özellikle Z2'de izlenen bu fokal nekrozların sirkülasyon bozukluğuna yol

açan bir mediatör aracılığı ile oluştuğu görüşünü desteklemektedir.

Bu çalışmada BCG'nin nadir görülen komplikasyonlarından biri olan tüberküloz oluşumu yanısıra, karaciğerde saptanan histopatolojik bulgular ile artan BCG dozları arasında belirgin bir fark görülmedi. Ancak, kontrol grubu ile deney grupları karşılaştırıldığında anlamlı hepatoselüler değişiklikler saptandı.

Bu değişikliklerin mediatör rol oynayan herhangi bir sitokin aracılığı ile olabileceği düşünülmekle beraber, bulgular, bu sitokinin BCG kullanımı ile salınan TNF- α ile oluştuğu görüşünü desteklemektedir. Diğer bir deyişle, LPS olsun veya olmasın yalnızca BCG kullanımının TNF- α 'nın başlattığı endotel harabiyeti ve bunun sonucunda da karaciğer dokusunda histopatolojik olarak kendini gösterdiği söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A. Cachectin, Tumour necrosis factor. *Lancet* 1989; 20: 1122-1126.
2. Beutler B, Cerami A. Cachectin: More than a tumor necrosis factor. *N Eng J Med* 1987; 316 (7): 379-385.
3. Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985; 230(4726): 630-632.
4. Bauss F, Dröge W, Mannel DN. Tumor necrosis factor mediates endotoxic effects in mice. *Infect Immun* 1987; 55(7): 1622-1625.
5. Satoh M, Inagawa H, Minagawa H, et al. Endogenous production of TNF in mice long after BCG sensitization. *J Biol Responce Med.* 1986; 5:117-123.
6. Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, et al: Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Eng J Med* 1989; 15: 1586-1591.
7. Rock G. Cell-mediated immune responses. In: Roitt IM, Brostoff J, Male DK. eds. *Immunology*. London, Churchill. Livingstone: Gower medical Publishing, 1989:9.1-9.14.
8. Matsumura H, Nakano M. Endotoxin - induced interferon- γ production in culture cells derived from BCG-infected C3H/HeJ mice. *J Immunol* 1988; 140 (2): 494-590.
9. Sun X, Hsueh W, Torre-Amione G. Effects of in vivo priming on endotoxin induced hypotension and tissue injur. The role of PAF and tumor necrosis factor. *Am J Pathol* 1990; 136 (4) : 949-956.
10. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986; 234 (oct): 470-474.
11. Cotran RS, Kumar V, Robins SL. *Robins pathologic basis of disease: Inflammation and repair*. 4th eid. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1989:39.
12. Edmondson HA, Peters RI. Liver. In: Anderson WAD, Kissane JM, ed. *Pathology*. Saint Louis: The C.V. Mosby Company, 1977; 1321-1488.
13. Düzcan E. Siklofosfamid ve steroid verilen farelerde oluşturulan edinsel E. coli sepsisinde uygulana farklı tedavilerin karaciğer histopatolojisi üzerine etkileri (tez) Sivas, Cumhuriyet Üniversitesi, 1990.