

Asit Sıvısında Tümör Nekrosis Faktör ve Solübl Tümör Nekrosis Faktör Reseptörü

U. YILMAZ, B. YILDIRIM, K. DALVA, Ç. BAYSAL, A. TEZEL, L. ONARAN

Özet: Toplam 43 hastada (17 komplike olmayan kronik karaciğer parankim hastalığı (KKPH) asiti, 9 infekte asit, 17 malign asit) asit ve serumda TNF- α , solübl TNF-reseptörü (TNF-r) p60 ve CRP düzeyleri araştırıldı. Tüm hastaların serum ve asitlerinde yüksek TNF- α , TNF-r ve CRP düzeyleri bulundu. Asit incelemelerinde en yüksek TNF- α ve TNF-r düzeyleri infekte asitte bulundu, bunu malign asit izledi. Her iki patolojik patolojik asit TNF- α ve TNF-r düzeyleri komplike olmayan KKPH asitindeki düzeylere göre anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p < 0.001$) kendi aralarında istatistiki fark bulunmadı ($p > 0.05$). Serum TNF- α ve TNF-r düzeyleri ise patolojik grupta belirgin yüksek bulunmasına rağmen sapmalar nedeni ile patolojik gruplarla komplike olmayan KKPH asiti arasında istatistiki fark bulunmadı ($p > 0.05$). Sapmalar düzeltildiğinde ise anlamlı fark bulundu ($p < 0.01$). Spontan bakteriyel peritonit (SBP) tanısı için asit TNF-r düzeyi sensitivite ve spesifitesinin yüksek olduğu saptandı.

Anahtar kelimeler: Asit, tanı, immünoloji, tümör nekroz faktör

Organizma inflamasyon, infeksiyon, kanser ve doku hasarı gibi durumlarda immun ve retikuloendotelyal sistem hücrelerinden sitokin denilen düşük molekül ağırlıklı solübl proteinler salgılanır. Sitokinler çeşitli biyolojik etkileri ile konağın immunolojik cevabını artırır, doku hasarını tamir eder ve hücrel sistemik hemostazı sağlar (1-3). önemli sitokinlerden biri olan Tümör Nekrosis Faktör'ün (TNF) birbirine benzer iki türü mevcuttur. Makrofaj - monosit ürünü TNF- α ve lenfosit ürünü TNF- β 'nin aktiviteleri birbirine çok benzer. TNF- α ve TNF- β hedef hücre yüzeyindeki aynı hücrelere bağlanır (4). Olgun TNF- α 17.000 Da ve TNF- β 25.000 Da molekül ağırlığındadır. Tnf reseptörleri ise 5.000 - 175.000 Da arasında değişmektedir (5).

Son yıllarda çeşitli nedenlerle oluşan akut veya kronik karaciğer hastalıklarında yüksek serum

Summary: TUMOR NECROSIS FACTOR AND SOLUBLE TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR LEVELS IN ASCITES

Ascites and plasma concentrations of TNF- α , soluble TNF-receptor (TNF-r) and CRP were measured in 43 patients (17 cirrhotic ascites, 17 malignancy-related ascites, 9 infected ascites). High TNF- α , TNF-r and CRP concentrations found in ascites and serum of different origins. Concentrations are present in high amounts in pathologic ascites. Patients with infected or malignancy-related ascites showed higher TNF- α , TNF-r and CRP concentrations in plasma than did patients with cirrhotic ascites. The serum concentrations showed a large overlap in all patients. Ascitic fluid concentrations of soluble TNF-r p60 in malignant and infected ascites resulted in diagnostic sensitivity 81% and spesivity 89%.

Key words: Ascites, diagnosis, immunology, tumornecrosis factor

TNF- α düzeyleri tespit edilmiştir. Ayrıca bu hastaların monositlerinde artmış TNF reseptörleri (TNF-r) belirlenmiştir (6). İnfekte ve malign asitte yüksek TNF- α düzeyleri belirlenirken TNF-r düzeyleri ile yapılmış çalışma çok azdır (7-9). çalışmamızda kronik karaciğer parankim hastalığı (KKPH) zemininde ve malignite zemininde gelişen asitte ve serumda TNF- α ve TNF-r p60 düzeyini araştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Mart 1992 - Aralık 1992 tarihleri arasında 29'u erkek, 14'ü kadın toplam 43 hastada araştırma yapıldı. Hastalar asit özelliğine göre 3 gruba ayrıldı: I. KKPH'na ait komplike olmayan asit. II. Spontan Bakteriyel Peritonit (SBP) asiti. III. Malign asit.

Grup I'de 11 erkek 6 kadın 17 hasta KKPH tanısı almıştı. Ultrasonografi (US), sitoloji ve biyokimyasal tetkiklerle malignite ve enfeksiyon

Tablo I: Çalışmaya alınan tüm hastaların serum biyokimyasal değerlerinin dökümü.

Özellik	K.O.KKPH	Enfeksiyon	Malignite
Hasta sayısı	17	9	17
Yaş	51.29 + 10.2	45.88 + 5.75	48.94 + 8.13
Cild-Pugh (A/B/C)	0/7/10	0/3/6	0/0/4
Hb	10.61 + 2.07	11 + 2.05	10.38 + 2.22
Bk	7547 + 4536	10355 + 3404	7111 + 2767
Pz	14.67 + 2.37	15.85 + 4.58	13.37 + 1.74
Pz%	45 + 8.2	41.3 + 3.7	58.2 + 15.7
Ptz	29.8 + 4.84	30.67 + 8.34	26.9 + 7.2
Akş	89 + 19	80 + 15	91.4 + 14
Kr	1.15 + 0.65	1.1 + 0.5	1.3 + 0.8
Ast	61.52 + 26.1	92.6 + 85.5	45.5 + 32.9
Alt	41.94 + 94	51 + 36	41.6 + 36.3
Ap	298.58 + 162.75	306.8 + 229.3	252.8 + 117.5
Alb	2.9 + 0.57	3.2 + 0.8	3 + 0.68
T. Bil.	4.9 + 2.5	9.6 + 11	2.67 + 4.14
Ldh	330 + 152	385.8 + 148.2	409.1 + 122.7
Kol	112.8 + 36.9	114.6 + 63.4	118.9 + 34.9

K.O.KKPH: Komplike olmayan Kr. Kc. Par. Hast.

ekarte edildi. Etyoloji 11 hastada B hepatiti, 5 hastada C hepatiti ve 1 hastada alkoldü. Yaş ortalaması 51.23 ± 10.2 idi. Grup ıı'de 6'sı erkek 3'ü kadın 9 hasta vardı ve hepsinde KKPH zemininde gelişen SBP tespit edilmişti. SBP tanısı asit sıvısında 5000/mm³ lökosit ve asit kültüründe üreme kriterlerine göre konuldu. Hastalık 8 vakada B hepatitine, 1 vakada ise C hepatitine bağlı idi. Yaş ortalaması 45.88 ± 5.75 olarak belirlendi. GrupII'de 12'si erkek 5'i kadın 17 hasta mevcut olup hepsinde maligniteye bağlı asit vardı. Malignite tanısı; asit etyolojisi, kitle , omentum ve karaciğer biyopsisi, endoskopi, US ve CT ile doğrulandı. Dört olguda hepatoma, 2'ser olguda metastatik karaciğer Ca, kolon, over ve non-Hodgkin lenfoma, 1'er olguda mezotelyoma, duodenum Ca. ve kolanjiyosellüler Ca. tanısı konuldu. Ortalama yaş 48.94 ± 8.13 idi. Aseptik şartlarda alınan kan ve asit örnekleri propilen tüplere konularak laboratuvara gönderildi. Yarım saat içerisinde santrifüje edilen örnekler üç eşit parçaya bölünerek -70o C'de saklandı. Serum ve asit örneklerinde TNF-a, solubl TNF-r ve C-Reaktif Protein (CRP) tüpler çözündükten sonra toplu olarak çalışıldı.

TNF-α düzeyi ELISA yöntemi ile tespit edildi (Endogen, USA). Kullanılan kit IL-1b, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, GM-CSF ve IFNγ ile cross reaksiyon vermiyordu. TNF-r p60 düzeyi yine ELISA yöntemi ile duplike olarak tayin edildi (BenderMed Systems, Avusturya). Belirlenebilen en düşük solubl TNF-r düzeyi 80 pg/ml idi. Deney içi CV

%3, deneyler arası CV %86 idi (CV= coefficient of variation %). CRP düzeyi ise dilüe edilmeden turbidimetrik kinetik yöntemle ölçüldü (Bechring, Almanya). ölçülebilen en düşük CRP düzeyi 0.5 mg/L idi.

Asit sıvısı bakteriyel kültürleri hasta yatağında alındı ve aerobik, anaerobik kan kültür vasatlarına kondu. Yöntem olarak kan kültür alma prensiplarına uyuldu ve şişeler hemen bakteriyoloji laboratuvarına gönderildi. Hastaların serum ve asit sıvısı biyokimyasal , hematolojik tetkikleri standart yöntemlerle yapıldı.

Gruplar arasındaki istatistiki değerlendirmeler nonparametrik Mann-Whitney U ve Paired T testleri ile belirlendi.

BULGULAR

Serum ALT, AST, AP düzeyleri KKPH ve SBP gruplarında malignite grubuna göre anlamlı olarak yüksek, albumin düzeyi ise anlamlı olarak düşük bulundu. Hemostaz testleri yine ilk iki grupta malignite grubuna göre anlamlı olarak bozulmuştu. Hastaların serum hematolojik ve biyokimyasal özellikleri Tablo I'de özetlenmiştir.

Asit sıvısı biyokimyasal özellikleri incelendiğinde gruplar arasında farklar gözlemlendi. Malign ve enfekte asitte albumin düzeyi komplike olmayan KKPH asitine göre anlamlı olarak yüksekti (p<0.001). Patolojik iki asit arasında ise fark yoktu. Malign asit LDH düzeyi diğer iki gruba göre anlamlı olarak yüksekti (p<0.001). Malign

Tablo II: Çalışmaya alınan tüm hastaların asit biyokimyasal değerlerinin dökümü.

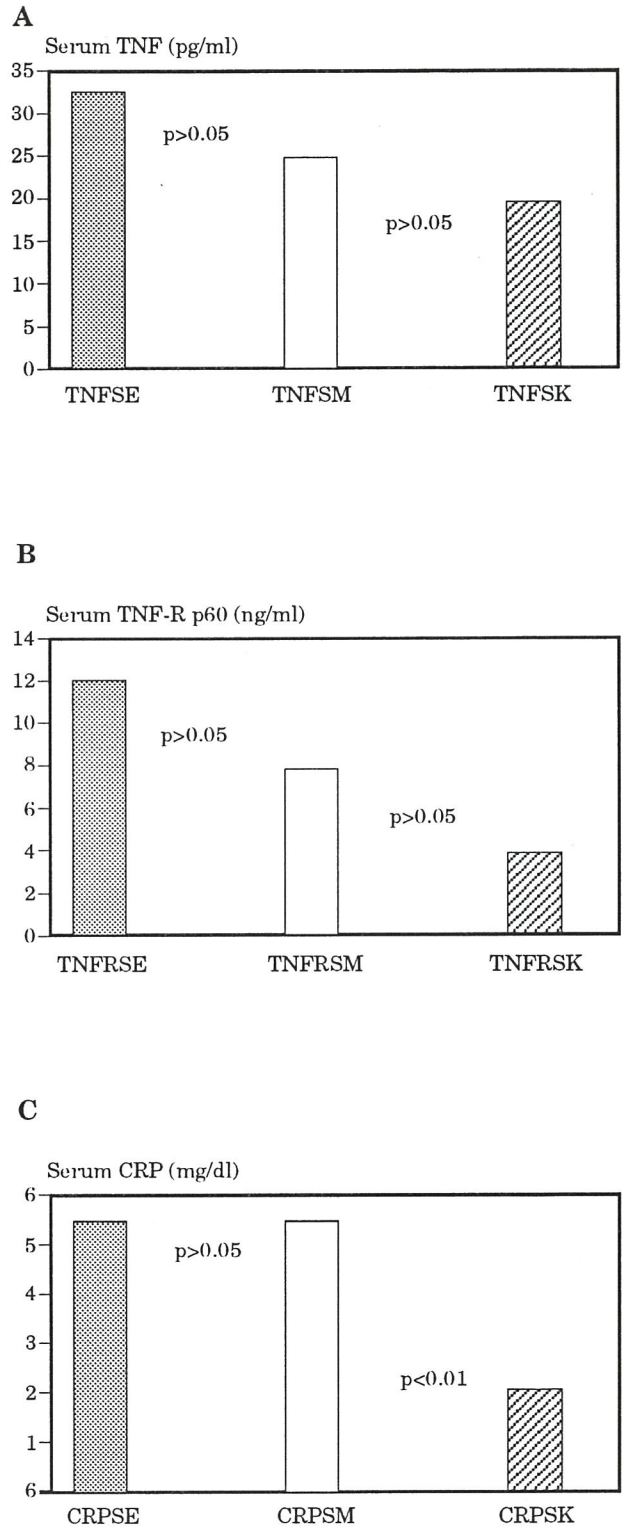
Özellik	K.O.KKPH.	Enfeksiyon	Malignite
A.Alb	1.2 + 0.7	2.78 + 1.29	3.2 + 1.2
A.Glu	78 + 35	85 + 25	79 + 22
A.Kol	27.2 + 29.3	28.2 + 20.42	36.1 + 26.8
A.Ldh	132.1 + 76.14	240.4 + 161.1	319.7 + 192.6
A.Bk	224.7 + 93.3	2644 + 1171	2647 + 1396
A.Ada	8.57 + 3.7	7.5 + 4.3	8.6 + 3.8

K.O.KKPH: Komplike olmayan Kr.Kc.Par.Hast.

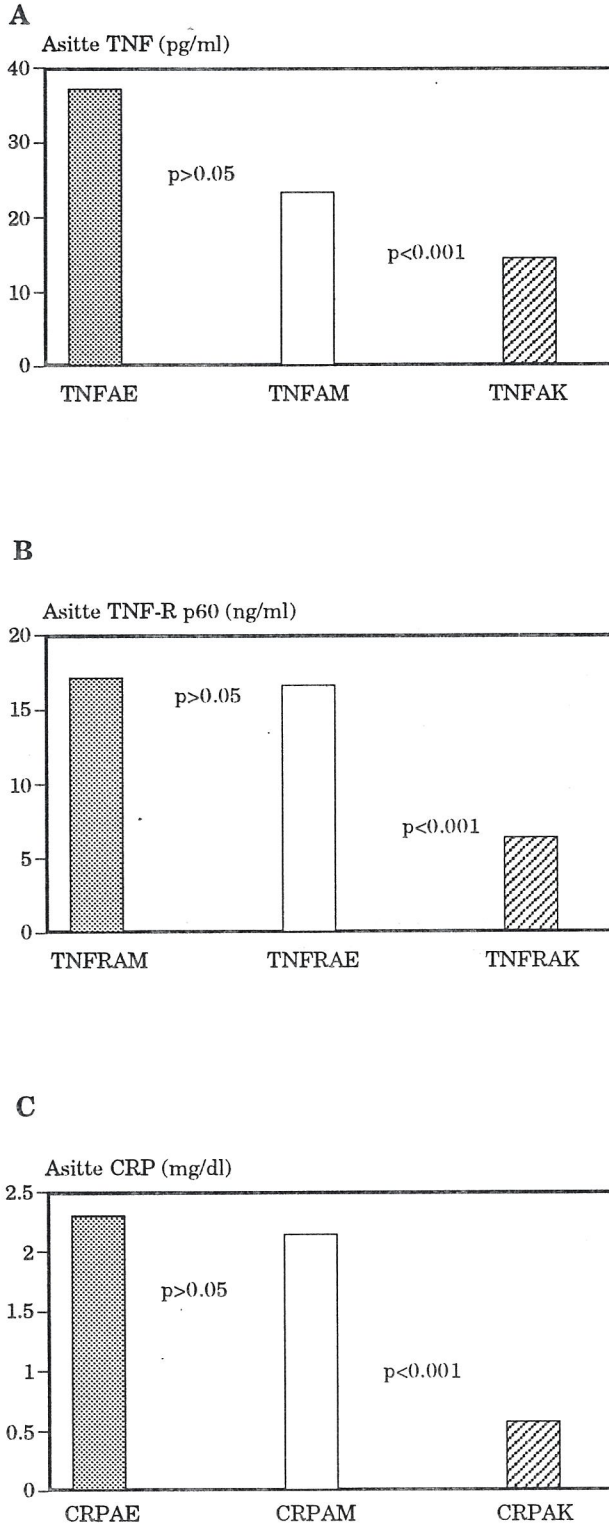
ve infekte asitte beyaz küre (BK) sayısı diğer iki gruba göre anlamlı yüksekti ($p<0.001$). Hastaların asit inceleme sonuçları Tablo II'de gösterilmiştir.

Serum TNF- α , TNF-r ve CRP düzeyleri: Serum TNF- α düzeyi komplike olmayan KKPH 'da 18.824 ± 18.16 pg/ml, infekte grupta 33.222 ± 24.445 pg/ml, malign grupta 28.235 ± 26.119 pg/ml olarak tespit edildi. En yüksek serum TNF- α düzeyi SGP grubunda, daha sonra malignite grubunda idi. Bu iki grup arasında istatistiki fark bulunmadı ($p>0.05$). Malignite ve enfeksiyon gruplarında değerler daha yüksek olmasına karşın uç değerler ve sapmalar nedeniyle komplike olmayan asite göre anlamlı fark bulunmadı ($p>0.005$). Serum TNF-r düzeyi komplike olmayan KKPH'da 4.444 ± 1.817 pg/ml, infekte grupta 11.9 ± 19.01 pg/ml, malign grupta ise 7.125 ± 8.028 ng/ml idi. Yine uç değerler ve sapmalar nedeni ile üç grup arasında fark bulunmadı ($p>0.05$). CRP serum düzeyi KKPH'da 2.352 ± 2.144 mg/dl, infekte grupta 5.587 ± 2.588 mg/dl, malign grupta 5.451 ± 4.414 mg/dl idi. En yüksek CRP düzeyi infekte grupta, daha sonra malign grupta gözlendi. İnfekte ve malign gruplardaki değerler komplike olmayan asitli hastalara göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.01$). Sonuçlar şekil 1'de grafik olarak gösterilmiştir.

Asit TNF- α , TNF-r ve CRP düzeyleri: Asit TNF- α düzeyi komplike olmayan asitte 14.111 ± 5.326 pg/ml, infekte asitte 36.471 ± 57.873 pg/ml, malign asitte 22.765 ± 28.184 pg/ml olarak ölçüldü. Patolojik asit değerleri komplike olmayan asitle karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı idi ($p<0.001$). İki patolojik asit arasındaki fark anlamsızdı ($p>0.05$). Asit TNF-r düzeyi komplike olmayan asitte 16.978 ± 8.812 ng/ml, malign asitte 17.257 ± 10.949 ng/ml idi. İnfekte ve malign solubl TNF-r düzeyleri diğer gruba göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.001$). Patolojik iki



Şekil 1: Hastaların TNF-alfa (A), TNF-reseptör (B) ve CRP (C) düzeyini gösteren grafikler



Şekil 1: Hastaların TNF-alfa (A), TNF-reseptör (B) ve CRP (C) düzeyini gösteren grafikler

asit arasındaki fark anlamsızdı ($p > 0.05$). Asit CRP düzeyi serumda olduğu gibi patolojik asitlerde anlamlı olarak yüksekti. Komplike olmayan asit CRP düzeyi 0.676 ± 0.497 mg/dl, infekte asitte 2.301 ± 1.682 mg/dl, malign asitte 2.236 ± 1.814 mg/dl idi. Patolojik iki asitin CRP değerleri komplike olmayan asite göre anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.001$). Yine patolojik iki asit arasında fark yoktu ($p > 0.05$)

TARTIŞMA

Son yıllarda SBP'de serum ve asit sıvısında TNF düzeylerinin araştırıldığı çeşitli klinik çalışmalar yapılmıştır. 1991 yılında Deviere, 1993 yılında Tilp ve arkadaşları yayınladıkları çalışmada SBP'li hastaların asitlerinde yüksek düzeyde TNF- α tespit etmişlerdir (7,8). Bizim çalışmamızda olduğu gibi SBP, malignite ve KKKPH gruplarında serum ve asitte solubl TNF-r düzeylerinin araştırıldığı az sayıda çalışma vardır. Bu konuda yapılan başlıca çalışma 1991 yılında İsviçre'de gerçekleştirilmiş ve patolojik asitte yüksek TNF- α 'nın yanısıra yüksek TNF-r düzeyleri belirlenmiştir (9).

Biz de çalışmamızda her üç grup hastada hem serum, hem asit sıvısında yüksek TNF- α ve solubl TNF-r düzeyleri belirledik. Patolojik asiti olan hastaların serum TNF- α ve TNF-r düzeylerindeki uç değerler düzeltildiğinde komplike olmayan KKKPH ile karşılaştırmasındaki farkın anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.01$). Malign ve infekte asit grubunda asit sıvısı TNF- α ve TNF-r düzeyleri serum düzeylerinden de yüksekti. Vücutta inflamasyon ve akut hücre hasarında yükselen, sitokinlerle karşılıklı etkileşen CRP'nin malign ve infekte asitli grupta serum ve asit düzeyleri anlamlı olarak yüksekti.

KKKPH seyrinde sitokinler düzeyinde değişiklikler saptanmaktadır. Hastaların monositleri ile yapılan çalışmalarda TNF salınımının arttığı, IL-g ve r-IL-2 stimülasyonu ile bu artışın hızlandığı gösterilmiştir. Bu TNF artışı monosit artışından çok fonksiyoneldir (6). TNF- α 'nın dolaşımında artması TNF reseptörlerinin de artışına neden olmaktadır. Diğer sitokinlerin yanısıra B ve C hepatiti partikülleri, mononükleer hücrelerin virüs tarafından infekte edilmesi TNF-r düzeylerini indüklemektedir. (6, 10, 11). SBP'li hastalarda lipopolisakkarit ve formil metionil lösil fenilalanin gibi bakteri ürünleri, maligniteli hastalarda tümör hücrelerinin karmaşık meka-

nizmalarla stimüllasyonu, aktive olan nötrofiller, mononükleer hücreler, fibroblastlar ve HL-60 hücre dizilerinden solubl TNF reseptörlerinin salınımına nedeb olmaktadır (12-15). Ayrıca birçok interferon ve interlökin çeşitleri TNF- α 'nın yanı sıra TNF-r için de uyarıcı olmaktadır (3).

TNF- α ve solubl TNF-r'nün peritoneal kaviteden klirensi ile ilgili yeterli bilgi yokyur. Ayrıca malign ve infekte asitte solubl TNF-r yoğunluğunun artma mekanizması tam olarak bilinmemektedir. çeşitli uyarılar sonucu infekte ve malign asitteki başta lökositler olmak üzere diğer hücreler TNF- α ve TNF-r düzeylerinin artmasından sorumludur. Asit sıvısındaki değerlerin daha yüksek olması TNF- α ve TNF-r'nin peritoneal boşluktaki hücrelerden lokal sentezine bağlıdır (9, 16), Bizim çalışmamızda asit CRP düzeyi de yüksek bulunmuştur. Peritonit ve peritonitis karsinomatoza nedeni ile kapiller geçirgenliğin artması, yarılanma ömrünün 18 saate kadar uzaması, lokal inflamatuvar olaylarda birikme özelliği yüksek asit CRP düzeyine neden olabilir (17, 18).

Genelde TNF'nin salınma amacı vücudu infeksiyon etkenlerine ve hasara karşı korumaktır.

KAYNAKLAR

1. Nathan CF; Secretory products of macrophages. J Clin invest 1987, 79: 319-26
2. Interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. Hepatology 1991, 13 (2): 256-61
3. Dinarello CA. interleukin -1 and the pathogenesis of acute phase response. N Eng J Med 1984, 1413-18
4. Agarwal BB, Kohr WJ, Hoss PE, et al.; Human tumor necrosis factor : production, purification and characterization. J Biol Chem 1985, 266: 2345-54
5. Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor: New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. J Biol Chem 1991, 266:7313-16
6. Yashioka K, Kakumu S, Arao M, et al.; TNF- α production by peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic liver disease. Hepatology 1989, 10(5): 769-73
7. Deviere J, Content J, Crusiaux A.; IL-6 and TNF- α in ascitic fluid during spontaneous bacterial peritonitis. Dig Dis Sci 1991, 36:123
8. Tilg H.; High levels of IL-6 and its secondary mediators in spontaneous bacterial peritonitis. Gastroenterology 1993, 105 (1): 310-11
9. Andus T, Gross V, Hobtege A, et al.; High levels of soluble tumor necrosis factor receptors in ascites. Hepatology 1992, 16(3): 749-55
10. Lau J, Sheron N, Mourri-Aria K, et al.; Increased TNF- α receptors number in chronic hepatitis B virus infections. Hepatology 1991, 14(1): 44-50
11. McClain CS, Cohon DA.; Increased TNF production by monocytes in alcoholic hepatitis. Hepatology 1989, 9 (3):349-51

Fakat septik şokta olduğu gibi, belirli bir düzeyi aşınca zararlı olmaktadır. TNF reseptörlerinin böyle bir durumda, doku hasarını önleyici modulator bir işlev gördüğü bildirilmektedir. TNF-r fragmanları TNF toksisitesini nötralize ederek klirensini hızlandırır ve sistemik etkisini azaltırlar. Bu tür etki için TNF- α 'dan 100-500 kez daha fazla salınması gerekmektedir. Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda TNF-r'ne TNF bağlayıcı protein adı verilmiştir (9, 19-21).

Malign asit tanısı genellikle fazla güçlük göstermez. Morbidite ve mortalitesi hala yüksek olan SBP tanısı önemli bir problemdir. SBP tanısı için en pratik yöntem asit sıvısında lökositin 500/mm³, parçalı lökositin 250/mm³ 'ün üzerinde olmasıdır. Bizim çalışmamızda malign ve infekte asit tanısı için TNF-r düzeylerinin sensitivitesi %81, spesifitesi %89 bulunmuştur. Buna karşılık rutin olarak uygulanan CRP'nin sensitivitesi ş, sensitivitesi ş bulunmuştur. SBP'li hastalarda TNF ve TNF-r'nün doğruluğunu ispatlamak için asit sıvısı lökosit sayısının yanı sıra diğer tanı koydurucu parametreler ile karşılaştırmalı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Bugün için bu tür çalışmalar deneysel ve pahalı olup klinik çalışmalara katkısı yoktur.

12. Lantz M, Gullberg V, Nilsson E, et al.; Characterization in vitro of human TNF binding protein: A soluble form of TNF receptor. J Clin invest 1990, 86: 1396-1402
13. Lau JYN, Sheron N, Nouri-Ario KR, et al.; increased TNF receptor number in chronic hepatitis B virus infection. Hepatology 1991, 14: 44-50
14. Grunfeld C, Palladino MA.; Tumor necrosis factor: immunologic, antitumor, metabolic and cardiovascular activities. Adv intern Med 1990, 35: 45-72
15. Parteu F, Nathan C.; Shedding of TNF receptors by activated human neutrophils. J Exp Med 1990, 172: 599-607
16. Yashioka K, Kakumu S, Murakami H, et al.; IL-2 activity in chronic liver disease: response by T cells and in the autologous mixed lymphocyte reaction. Clin Exp immunol 1984, 56: 668-76
17. Ballou SP, Kushner I; C-reactive protein and the acute phase response. Adv intern Med 1992, 37: 313-37
18. Duclos TW, Mold C, Paterson PY, et al.; Localization of CRP in inflammatory lesions of experimental allergic encephalomyelitis. Clin Exp immunol 1981, 43: 565-73
19. Tosti FM, Dieckmon B, Cerami A, et al.; A macrophage factors inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia. Science 1985, 229: 867-69
20. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, et al.; identity of tumor necrosis factor and the macrophage secreted factor cachectin. Nature 1985, 316: 552-54
21. Loetscher H, Geutz R, Zuluof M, et al.; Recombinant 55 kDa TNF receptor. J Biochem Mol Biol 1991, 266 (27): 18324