

Strokovni prispevek/Professional article

DIAGNOSTIČNA VREDNOST ADENOZIN DEAMINAZE IN LIZOZIMA PRI PLEVRALNIH IZLIVIH

DIAGNOSTIC UTILITY OF ADENOSINE DEAMINASE AND LYSOZYME IN PLEURAL FLUIDS

Biljana Ilievska-Poposka, Nada Minovska, Stefan Talevski, Sonja Atanasova, Marija Metodieva, Karolina Pilovska

Inštitut za pljučne bolezni in tuberkulozo, Medicinska fakulteta Skopje, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Makedonija

Prispelo 2004-06-08, sprejeto 2004-11-18; ZDRAV VESTN 2005; 74: 143–6

Ključne besede: lizozim; adenzin deaminaza; pleuralni izlivi; pleuralna tekočina; diferencialna diagnoza

Izvleček – Izhodišča. Etiološko diagnosticiranje pleuralnih izlivov je večkrat težko in zahteva invazivne diagnostične postopke. Odkrivanje označevalcev, ki omogočajo diferencialno diagnozo vsaj med malignimi in nemaligimi pleuralnimi izlivi, je predmet več raziskav.

Metode. Določali smo raven adenzin deaminaze (ADA) in lizozima v pleuralni tekočini in v serumu 84 bolnikov, od teh 52 s pleuralnim izlivom s tuberkulozno in 32 z maligno etiologijo. Uporabljeni sta metoda Gusti/Galcanti in turbidimetrijska kinetična metoda.

Rezultati. V skupini s tuberkuloznim pleuralnim izlivom v primerjavi s skupino z malignim pleuralnim izlivom so bile izmerjene znatno višje koncentracije ADA in lizozima v pleuralni tekočini (ADAp; Lp) ter v serumu (ADAs; Ls). Meje vrednosti razmerja ADAp/ADAs in Lp/Ls, ki naj bi bile pomembne v diferencialni diagnostiki med malignimi in tuberkuloznimi pleuralnimi izlivi, so 1,8 za ADA in 1,5 za lizozim. Razlika med dvema skupinama z dvema testoma je signifikantna ($p < 0,001$). V skupini s tuberkuloznim pleuralnim izlivom ima 76,9% bolnikov vrednosti enake ali višje od 1,8 (= ali $> 1,8$) za razmerje ADAp/ADAs, medtem ko v skupini z malignim pleuralnim izlivom to velja za 9,4% bolnikov. Kar se tiče lizozima v skupini s tuberkuloznim pleuralnim izlivom, ima 84,6% bolnikov razmerje Lp/Ls enako ali večje od 1,5 (= ali $> 1,5$), v skupini z malignim pleuralnim izlivom pa je samo 3,1%. Pri diagnosticiranju tuberkuloznega pleuralnega izliva s testi ADAp/ADAs in Lp/Ls je občutljivost 76,90% in 84,16%, specifičnost pa 90,62% in 96,87%, napovedna vrednost za pozitivne izvide 93,02% in 97,77%, napovedna vrednost za negativne izvide 70,73% in 79,48%, diagnostična zanesljivost pa 82,14% in 89,28%.

Zaključki. Testa ADAp/ADAs in Lp/Ls sta enostavni in hitri metodi, ki se lahko uporabita za presejanje v diferencialni diagnostiki malignih in tuberkuloznih pleuralnih izlivov.

Key words: lysozyme; adenosin deaminase; pleural effusion; pleural fluid; differential diagnosis

Abstract – Background. The diagnosis of pleural effusions is sometimes difficult and needs invasive diagnostic procedures; the search for markers that will at least allow to obtain a differential diagnosis between malignant and benign effusions is the objective of many studies.

Methods. The level of adenosine deaminase (ADA) and lysozyme in pleural fluid and serum was determined in 84 patients (52 with tuberculous pleural effusions – TB and 32 with malignant pleural effusions – CA), by Giusti/Galcanti and turbidimetric kinetic method.

Results. In the group with TB there were significant higher serum and pleural fluid concentrations of ADA (ADAp; ADAs) and lysozyme (Lp; Ls) compared to CA. In the differential diagnosis between tuberculous and malignant pleural effusion ratios ADAp/ADAs = or > 1.8 and Lp/Ls = or > 1.5 were accepted as a cutoff level. We found significant differences between two groups in both tests ($p < 0.001$): in the group with TB 76.9% of patients had ADAp/ADAs ratio = or > 1.8 contrary to the group with CA where the percentage is only 9.4%. In the group with TB there were 84.6% of patients with Lp/Ls ratio = or > 1.5 , contrary to the group with malignancy where the percentage is only 3.1%. ADAp/ADAs ratio of 1.8 and Lp/Ls ratio of 1.5 showed sensitivity of 76.92% and 84.65%, specificity of 80.70% and 87.71%, positive predictive value of 78.43% and 86.27%, negative predictive value of 78.83% and 86.20% and diagnostic accuracy of 78.83% and 86.23% in the diagnosis of tuberculous pleurisy, separately.

Conclusions. These results suggest that the determination of the Lp/Ls and ADAp/ADAs ratios provides a simple and rapid method which can be used as a screening test in the differential diagnosis between tuberculous and malignant pleural effusions.

Uvod

Adenozin deaminaza (EC.3.5.4.4.), ki jo je Spencer in cop imenoval ADA, je encim purinskega katabolizma, ki katalizira ireverzibilno reakcijo adenozina v inozin (1). ADA je prisotna skoraj v vseh tkivih človeškega organizma (2). V celicah je v citoplazmi. Največjo aktivnost ima v vranici in prebavilih, nato v limfnih žlezah, srcu, malih možganih, hrbtenjači in v pljučih. Njena fiziološka vloga je zelo pomembna v limfnem tkivu. Koncentracija ADA je v limfocitih 10-krat večja kot v eritrocitih, predvsem v limfocitih T z variacijami glede na celično diferenciacijo (3). Lizozim (muramidaza) je bakteriolitičen kationski protein z nizko molekularno težo 14,500 (4). Pogosto je znotraj celice in hidrolizira beta 1-4 glikozoidno povezavo med N-acetil muraminsko kislino in N-acetil glikozaminom v peptoglikanu na celičnih stenah bakterij. V človeškem organizmu je lizozim prisoten v skoraj vseh tkivih in organih, največ ga je v makrofagih in solzah, nekaj manj v slini, mleku, placenti ter v plazmi (5). Značaj in vloga ADA in lizozima se raziskuje pri večjem številu boleznih. Del raziskovanj se nanaša na pomembnost določanja aktivnosti ADA (ADAp) in lizozima (LP) v pleuralni tekočini (6, 7) ter na vrednost sorazmerja, ki ga dobimo pri hkratnem določanju ADA in lizozima v pleuralni tekočini in v serumu (ADAp/ADAs; Lp/Ls) v diferencialni diagnozi plevritisov različne etiologije (8).

Cilj tega raziskovalnega dela je evalviranje vloge in pomena dobljenih vrednosti s hkratnim določanjem razmerja ADAp/ADAs in Lp/Ls v diferencialni diagnozi pri bolnikih s pleuralnim izlivom maligne in tuberkulozne etiologije ter določanje uporabe teh testov v vsakdanji praksi.

Materiali in metode

Raziskava zajema 84 oseb s pleuralnim izlivom, ki so se zdravili na Inštitutu za pljučne bolezni in tuberkulozo. Glede etiologije pleuralnih izlivov so bolniki razdeljeni v dve skupini:

1. *Pleuralni izlivi s tuberkulozno etiologijo* (TB): 52 oseb (30 moških in 22 žensk), starih med 17 in 87 let, srednja starost 39 let. Diagnoza je bila postavljena na temelju pozitivnega bakteriološkega izida ali histološkega izida biopsije plevre.
2. *Pleuralni izlivi z maligno etiologijo* (CA): 32 oseb (22 moških in 10 žensk), starih med 43 in 81 let, srednja starost 64 let. Diagnoza vseh je temeljila na citoloških in/ali histoloških analizah. Primarni tumor je umeščen na pljučih v 19 primerih, dva v jajčnikih, 4 tumor dojke, 4 tumor plevre (mezoteliom), eden je imel melanom, pri enem pa je primarna umestitev tumorja ostala neznan.

Raven lizozima v serumu in v pleuralni tekočini smo določali s turbodimetrijsko kinetično metodo z uporabo suspenzije (2,2 g *Micrococcus lysodeeeticus* na liter fosfatnega puфра). Vzorci krvi in slin so bili zbrani hkrati pred začetkom zdravljenja. Po odvzemu so bili centrifugirani in nato zamrznjeni na -20°C , vse do začetka analize.

Adenozin deaminaza je bila določena v istih vzorcih seruma in pleuralnega punktata s kolorimetrijsko metodo Gusti in Galcanti.

Statistična analiza signifikantnosti razlike v velikostih zmerjenih koncentracij ADA in lizozima v serumu in v punktatu je bila izdelana z neparametrijskim testom Mann-Whitney U. Stopnja povezanosti med ravnijo ADA in lizozima v pleuralni tekočini in v serumu je bila določena s koeficientom korelacije. Statistična analiza vrednosti iz sorazmerja ADAp/ADAs in Lp/Ls je bila izdelana s testom za določanje pomembnosti razlike med odstotki.

Rezultati

Srednje vrednosti (s. v.) in standardne deviacije (std. dev.) zmerjenih koncentracij lizozima v serumu (Ls) in v pleural-

nem izlivu (LP) pri bolnikih iz raziskovalnih skupin so prikazane v razpredelnici 1.

Razpr. 1. *Srednje vrednosti in standardne deviacije zmerjenih koncentracij lizozima v pleuralnih izlivih in v serumu raziskovalnih skupin.*

Table 1. *Mean concentrations and standard deviation (SD) of the lysozyme in the pleural fluids and serum in different groups.*

Skupina / Group	Število / Number	s. v. Lp / Mean Lp	std. dev. / SD*	s. v. Ls / Mean Ls	std. dev. / SD
TB	52	33,70	24,97	15,15	11,12
CA	32	8,70	2,73	9,34	2,51

Zmerjene koncentracije lizozima v pleuralnih punktatih in v serumu so znatno višje v skupini bolnikov s tuberkulozno etiologijo v primerjavi s skupino bolnikov z maligno etiologijo pleuralnih izlivov. Statistična obdelava dobljenih vrednosti z Mann-Whitney testom U je pokazala visoko značilno statistično razliko (sig. stat. raz.): za pleuralne koncentracije $U = 73,5$, $p = 0,0000$, $p < 0,001$ in za serumske koncentracije $U = 514$, $p = 0,003$, $p < 0,01$. Podobne izide smo dobili tudi z analizo zmerjenih koncentracij ADA v pleuralnih izlivih in v serumu bolnikov. Znatno višje koncentracije so bile izmerjene v skupini bolnikov z tuberkuloznim pleuralnim izlivom, tako v pleuralnih punktatih ($U = 349$, $p = 0,0000$, $p < 0,001$), kakor tudi v serumih ($U = 611,5$, $p = 0,04$, $p < 0,05$). Vrednosti so prikazane v razpredelnici 2.

Razpr. 2. *Srednje vrednosti in standardne deviacije koncentracije ADA v pleuralnih izlivih in v serumu raziskovalnih skupin.*

Table 2. *Mean concentration and standard deviation (SD) of ADA in the pleural fluid and serum in the different groups.*

Skupina / Group	Število / Number	s. v. ADAP / Mean ADAP	std. dev. / SD*	s. v. ADAs / Mean ADAs	std. dev. / SD
TB	52	65,31	34,61	23,75	15,29
CA	32	29,22	16,18	28,60	15,32

Korelacija med ravnijo lizozima v pleuralni tekočini in v serumu v dveh skupinah je razvidna v razpredelnici 3. Skupina s pleuralnimi izlivi z maligno etiologijo ima boljši indeks korelacije ($r = 0,85$) kot skupina s tuberkuloznimi izlivi ($r = 0,65$).

Razpr. 3. *Koeficient korelacije med ravnijo lizozima v pleuralni tekočini in v serumu raziskovalnih skupin.*

Table 3. *Correlation coefficient between pleural fluid level and serum level of lysozyme.*

Skupina / Group	r	p vrednost / p value
TB	0,65	< 0,05
CA	0,85	< 0,05

Tudi za ADA so indeksi korelacije med ravnijo v pleuralni tekočini in v serumu raziskovalnih skupin podobni: Boljši indeks korelacije ($p = 0,69$) ima skupina z malignimi pleuralnimi izlivi od skupine s tuberkuloznimi izlivi ($p = 0,41$) (razpr. 4).

Razpr. 4. *Koeficient korelacije med ravnijo ADA v pleuralni tekočini in v serumu raziskovalnih skupin.*

Table 4. *Correlation coefficient between pleural fluid level and serum level of ADA.*

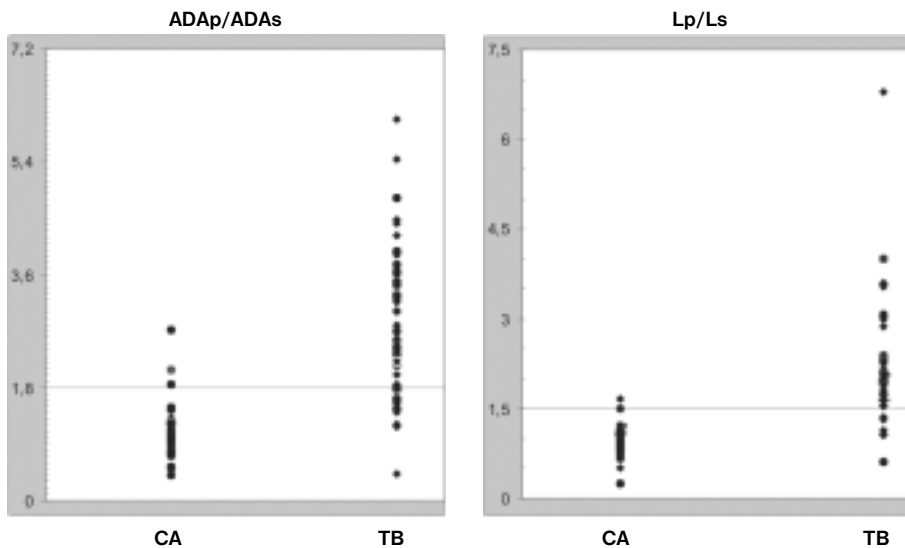
Skupina / Group	r	p vrednost / p value
TB	0,41	< 0,05
CA	0,69	< 0,05

Mejne vrednosti razmerja ADAP/ADAs in Lp/Ls, ki naj bi bile pomembne v diferenciaciji diagnosticiranja med malignimi in tuberkuloznimi plevralnimi izlivmi, so: 1,8 za ADAP/ADAs in 1,5 za Lp/Ls. Vrednosti so določene na podlagi že končanih analiz v Biokemičnem laboratoriju Inštituta za pljučne bolezni in tuberkulozo v Skopju (9).

Na sliki 1 so prikazane vrednosti iz sorazmerja ADAP/ADAs in Lp/Ls pri vsakem bolniku. Sorazmerje ADAP/ADAs enako ali višje od 1,8 ima 40 bolnikov oziroma 76,9% iz skupine s tuberkuloznimi plevralnimi izlivmi, 12 bolnikov ali 23,1% ima sorazmerje manjše od 1,8.

Mejna vrednost za sorazmerje Lp/Ls je 1,5. Pri tuberkuloznih plevralnih izlivih ima 44 bolnikov oziroma 84,6% vrednosti enake ali večje od 1,5, medtem ko ima 15,4% bolnikov vrednosti, manjše od 1,5.

V skupini z malignimi plevralnimi izlivmi se samo pri enem bolniku ali 3,1% srečujemo z sorazmerjem Lp/Ls > 1,5, medtem ko je pri vseh ostalih to sorazmerje manjše od mejne vrednosti. S testom za vrednotenje statistične značilnosti razlike med odstotki, med skupinama TB in CA z dvema testoma je ugotovljena sig. stat. raz. ($p = 0,00000$, $r < 0,001$).



Sl. 1. ADAP/ADAs in Lp/Ls pri bolnikih s tuberkulozno in maligno etiologijo plevralnih izlivov; označena črta predstavlja omejene vrednosti od 1,8 za ADAP/ADAs in 1,5 za Lp/Ls.

Figure 1. ADAP/ADAs and Lp/Ls in the patients with different type of pleural effusion. Horizontal dotted line indicates level of ADAP/ADAs ratio of 1.8 and Lp/Ls ratio of 1.5.

Evalvacija vrednosti dveh testov glede njihove uporabnosti v klinični praksi pri tuberkuloznih plevralnih izlivih je izdelana z naslednjimi parametri: senzitivnost (Se), specifičnost (Sp), prognostična vrednost za pozitivne izvide (PVP), prognostična vrednost za negativne izvide (PVN) in diagnostična zanesljivost (DZ). Kot diskriminacijske vrednosti so vzete za ADAP/ADAs = ali > 1,8 in za Lp/Ls = ali > 1,5. Izidi so prikazani v razpredelnici 5.

Razpr. 5. Vrednost posameznih parametrov, ocenjenih s statističnimi metodami pri določeni diskriminacijski točki, v odstotkih.

Table 5. The values of parameters assessed by statistical methods at determined point in percents.

Test	Se	Sp	PVP	PVN	DZ
ADAP/ADAs	76,92	90,62	93,02	70,73	82,14
Lp/Ls	84,61	96,87	97,77	79,48	89,28

Analiza povezanosti vrednosti iz sorazmerja ADAP/ADAs in Lp/Ls je pokazala visoko stopnjo korelacije $r = 0,53$, $p < 0,05$.

Razpravljanje

Lizozim je bakteriolitični encim, ki ima zelo pomembno vlogo v epitelioidnih celicah, makrofagih ter v gigantskih celicah aktivnih granulomov in granulocitih iz gnojnih eksudatov. Lizozim zrcali aktivnost svežih granulomov glede obtoka nevofilcev in ledvične funkcije. S povečanimi vrednostmi lizozima se, razen pri granulomatozah, srečujejo tudi pri drugih vnetnih procesih, septičnih stanjih ter pri mieloproliferativnih boleznih. ADA je predvsem encim limfocitov T in njene vrednosti kažejo lokalno aktivnost limfocitov (10). Računa se, da so zvišane vrednosti ADA in lizozima v plevralnem prostoru, predvsem pri tuberkuloznih plevritisih in empiemih rezultat lokalnega dogajanja (6). Lizozim se v plevralnem prostoru pri tuberkulozi (TB) sprošča iz epitelioidnih celic nekrotiziranih granulomov in mononuklearnih fagocitov. Razlog za visoko aktivnost ADA v tuberkuloznih plevralnih izlivih ni dovolj pojasnjen. Znano pa je, da je aktivnost ADA

povečana v plevralnih izlivih, v katerih prevladujejo limfociti, najbolj pogosto pri tistih, ki so tuberkuloznega porekla (11). Na drugi strani pa je aktivnost ADA v plazmi visoka pri boleznih, pri katerih se stimulira celična imunost, kar TB je ena od teh bolezni. Naši rezultati kažejo na pomembno zvišano raven ADA in lizozima v plevralnih punktatih in v serumih skupine s tuberkulozno etiologijo v primerjavi s skupino z maligno etiologijo, kar je v skladu z rezultati drugih avtorjev (7, 8, 12, 13). Diagnostični pomen za tuberkulozni plevritis imajo vrednosti ADA, ki so višje od 50 IU/ml. Z višjimi vrednostmi se srečujejo tudi pri drugih boleznih, kot so revmatoidni artritis, limfom, levkemija in pri empiemih, zato teh stanj z aktivnostjo ADA v plevralnih punktatih ni mogoče diferencirati. To si razlagamo z obstojem dveh molekularnih oblik ADA - velike in majhne; Pri tuberkuloznih izlivih je verjetno prisotna samo velika oblika, a pri drugih plevralnih izlivih z visoko aktivnostjo ADA sta prisotni obe obliki, prevladuje pa mala (12).

Pri tuberkuloznih plevralnih izlivih smo med ravnijo encimov v plevralni tekočini in v serumu dobili pozitiven koeficient korelacije (ADA $r = 0,41$, lizozim $r = 0,65$), kar pomeni, da pri TB raste tudi serumska raven ADA in lizozima. V skupini z malignimi plevralnimi izlivmi sta aktivnosti ADA in lizozima v serumu in v plevralni tekočini nizki, ampak s pozitivnimi koeficienti korelacije, ki so višji v primerjavi s skupino s TB (ADA $r = 0,69$, lizozim $r = 0,85$). Višji koeficienti korelacije ravni ADA in lizozima v plevralnih punktatih in v serumu pri malignih plevralnih izlivih pri razmerju punktata/serum okrog 1 so zaradi encimov v plevralni tekočini: njihova raven je rezultat filtracije ali difuzije sistemskega obtoka, ne pa lokalne produkcije. Čeprav oba encima prihajata iz različnih celic, se pri tuberkuloznem procesu sprostita hkrati. Ugotovili smo dobro korelacijo med vrednostmi ADAP/ADAs in Lp/Ls ($r = 0,74$), zato določanje obeh parametrov hkrati zvečuje diagnostično zanesljivost v primerjavi z določanjem samo enega parametra. Po mnenju nekaterih avtorjev (4, 6, 8) je sorazmerje Lp/Ls > 1,2 zelo pomembno pri diferencialni diagnozi tuberkuloznih in netuberkuloznih plevralnih izlivov, razen empiemov.

Upoštevali smo mejno vrednost sorazmerja Lp/Ls 1,5 in dobili rezultate, ki kažejo, da se test z visoko zanesljivostjo lahko uporablja pri diferencialni diagnozi med tuberkuloznimi in malignimi pleuralnimi izlivi. Podobni so izidi, ki se nanašajo na sorazmerje ADap/ADAs z mejno vrednostjo 1,8 pri diferencialni diagnozi med tuberkuloznimi in malignimi izlivi.

Zaključki

Testa ADap/ADAs in Lp/Ls se lahko uporabita kot začetna klinična preiskava plevralne tekočine, še posebej v populaciji, v kateri je TB pogosta bolezen. Imajo vlogo presejalnega testa in v začetnem diferencialnem diagnosticiranju ločujejo plevralne izlive tuberkulozne in maligne etiologije, preden bomo z določenimi invazivnimi diagnostičnimi postopki dobili rezultate bakterioloških in/ali patohistoloških analiz, ki bodo omogočili končno diagnozo. Testi niso dragi, so sorazmerno enostavni, hitri in se dopolnjujejo drug z drugim.

Literatura

1. Martin DW Jr, Gelfand EW. Biochemistry of diseases of immunodevelopment. *Ann Rev Biochem* 1981; 50: 845-77.
2. Van Der Weyden MB, Kelly WN. Human adenosine deaminase: distribution and properties. *J Biol Chem* 1976; 251: 5448-56.
3. Barton R, Martiniuk F, Hirschhorn R, Goldschneider I. The distribution of adenosine deaminase among lymphocyte populations in the rat. *J Immunol* 1979; 122: 216-20.
4. Klockars M, Reitamos S. Tissue distribution of lysozyme in man. *J Histochem Cytochem* 1975; 23: 932-40.
5. Light RW. Pleural diseases. Philadelphia: Lea & Febiger; 1983.
6. Vereza Hernando HR, Masa Jimenez JF, Dominiguez Juncal L, Perez Garcia-Buela J, Martin Egana MT, Fontan Bueso J. Meaning and diagnostic value of determining the lysozyme level of pleural fluid. *Chest* 1987; 91: 342-5.
7. Ocana I, Martinez-Vazquez JM, Sequra RM, Fernandez-De-Sevilla T, Capdevila JA. Adenosin deaminase in pleural fluids; Test for diagnosis of tuberculosis pleural effusion. *Chest* 1983; 84: 51-3.
8. Fontan Bueso J, Vereza Hernando H, Perez Garcia-Buela J, Dominiguez Juncal L, Martin Egana MT, Montero Martinez MC. Diagnostic value of simultaneous determination of pleural adenosine deaminase and pleural lysozyme/serum lysozyme ratio in pleural effusions. *Chest* 1988; 93: 303-7.
9. Nolcev S. The meaning of lysozyme, adenosin deaminase and immunological markers in pleural fluid for diagnosis and differential diagnosis of pleural effusions (dissertation). Skopje: Medical Faculty; 1989.
10. Spore A, Dosch HM, Gelfand EW. Role of adenosine deaminase in the early stages of precursor T-cell maturation. *Clin Exp Immunol* 1981; 44: 152-5.
11. Piras MA, Gakis C, Brudoni M, Andreoni G. Adenosine deaminase activity in pleural effusions: An aid to differential diagnosis. *Br Med J* 1978; 2: 1751-2.
12. Ocana I, Ribera E, Martinez-Vazquez JM, Ruiz I, Bejarano E, Pigrau C, Pahissa A. Adenosine deaminase activity in rheumatoid pleural effusion. *Ann Rheum Dis* 1988; 47: 394-7.
13. Ungerer JP, Brobler SM. Molecular forms of adenosine deaminase in pleural effusions. *Enzyme* 1988; 40: 7-13.