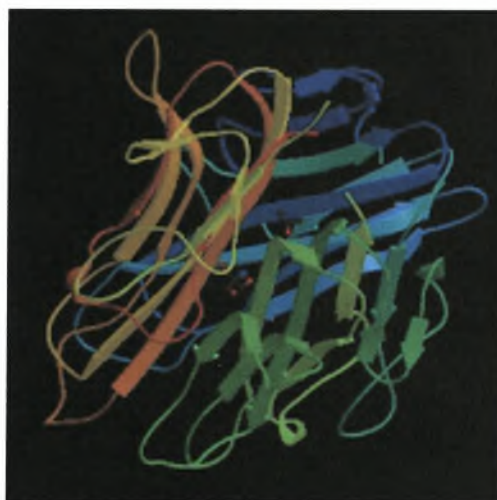


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Εκπόνηση: Οικονομίδα Σμαράγδα-Ελένη**

**ΘΕΜΑ: Προσδιορισμός TNF- $\alpha$  & CEA στο πλευριτικό υγρό και στο αίμα ασθενών με υπεζωκοτική συλλογή.**



**Επιβλέπων καθηγητής: Κωνσταντίνος Ι. Γουργουλιάνης.**

**Τριμελής Επιτροπή: Κωνσταντίνος Ι. Γουργουλιάνης, Διευθυντής Πανεπιστημιακής**

**Πνευμονολογικής Κλινικής**

**Δημήτριος Κουρέτας, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος**

**Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας**

**Σπυρίδων Λάφης, Διδάκτωρ Χημείας Τμήματος Ιατρικής**

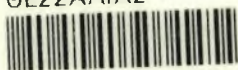
**ΛΑΡΙΣΑ 2005**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 4437/1  
Ημερ. Εισ.: 19-09-2005  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2005  
ΟΙΚ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087896



► **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:**

*Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κ.Γουργουλιάνη, Διευθυντή της Πνευμονολογικής Κλινικής του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, για την επιστημονική βοήθεια, τις συμβουλές και τις πολύτιμες παρατηρήσεις του.*

*Τον κ. Θ.Κυρόπουλο, επιστημονικό συνεργάτη της Πανεπιστημιακής Πνευμονολογικής Κλινικής, για την πολύτιμη καθοδήγησή του στην εκτέλεση των πειραμάτων και την συγγραφή της εργασίας, όπως και τον κ. Κ.Κωστίκα, Ειδικό Πνευμονολόγο και επιστημονικό συνεργάτη της ίδιας κλινικής, για την σημαντική βοήθεια στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.*

*Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, κ. Δ.Κουρέτα και τον κ. Σ.Λάφη, Διδάκτωρ Χημείας του Τμήματος Ιατρικής, για την κριτική ανάγνωση της εργασίας αυτής, ως μέλη της τριμελούς επιτροπής.*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|  |       |
|--|-------|
| 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....   | 4     |
| 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....   | 5     |
| 3. ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ.....  | 6-17  |
| Ανατομία.....  | 6-7   |
| Υπεζωκοτική συλλογή.....   | 7-8   |
| Σχηματισμός απορρόφησης του πλευριτικού υγρού.....   | 8-10  |
| Παθοφυσιολογία παραγωγής του πλευριτικού υγρού.....  | 10-11 |
| Ανάλυση του πλευριτικού υγρού.....   | 12-17 |
| 4. ΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ<br>ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ.....                    | 17-22 |
| Χαρακτηριστικά πλευριτικού υγρού σε παθολογικές καταστάσεις.....                             | 18-22 |
| 5. ΚΑΡΚΙΝΟΕΜΒΡΥΪΚΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ (CEA) ΚΑΙ ΟΓΚΟΝΕΚΡΩΤΙΚΟΣ<br>ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (TNF- <i>alpha</i> )..... | 22-24 |
| 6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....  | 25-33 |
| Σκοπός.....  | 25    |
| Υλικά και Μέθοδοι.....   | 26-33 |
| 7. ΒΑΣΙΚΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ<br>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....                                | 34-35 |
| 8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....   | 36-44 |
| Αποτελέσματα CEA.....  | 37-40 |
| Αποτελέσματα TNF- <i>alpha</i> .....   | 41-44 |
| 9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....   | 45-46 |
| 10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....  | 47    |
| 11. ABSTRACT.....  | 48    |
| 12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....  | 49-52 |



## 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της εργασίας ήταν να εκτιμηθεί ο ρόλος του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) και του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF- $\alpha$ ) στη διαφοροδιάγνωση των υπεζωκοτικών συλλογών.

Με χρήση ανοσοπροσοροφητικής δοκιμασίας στερεάς φάσεως (ELISA) και ανοσοαντίδρασης ηλεκτροχημειοφωταύγειας (ECL), οι συγκεντρώσεις του TNF- $\alpha$  και CEA αντίστοιχα, μετρήθηκαν στο πλευριτικό υγρό και τον ορό ασθενών με κακοήγη υπεζωκοτική συλλογή (n=57), με φυματίωση (n=25), με παραπνευμονική συλλογή (n=15) και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (n=27).

Τα επίπεδα του CEA βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στο πλευριτικό υγρό ασθενών με κακοήγη υπεζωκοτική συλλογή σε σχέση με τις υπόλοιπες κατηγορίες ασθενών ( $p < 0.05$ ). Σύμφωνα με τη ROC ανάλυση και οριακή τιμή τα 2.49 ng/mL, η ευαισθησία του έφθασε το 68.4% και η ειδικότητά του το 92.3%. Η συγκέντρωση του TNF- $\alpha$  στο πλευριτικό υγρό βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς με εξιδρωματική υπεζωκοτική συλλογή σε σχέση με τους ασθενείς με διδρωματική υπεζωκοτική συλλογή ( $p = 0.0018$ ). Ιδιαίτερα σημαντική αύξηση παρουσίασε στην ομάδα ασθενών με φυματίωση σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες ασθενών ( $p = 0.0001$ ). Η ευαισθησία και η ειδικότητα του TNF- $\alpha$  στη διάκριση της φυματιώδους πλευρίτιδας από τις άλλες ομάδες, με όριο τα 88.1 pg/mL, έφθασε το 96% και 87.9% αντίστοιχα, ενώ με όριο την ίδια τιμή, παρουσίασε επίσης υψηλή ευαισθησία (96%) και ειδικότητα (93%) στη διάκριση των λεμφοκυτταρικών υπεζωκοτικών συλλογών. Η συγκέντρωσή του στον ορό δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά για τις τέσσερις κατηγορίες ασθενών ( $p > 0.05$ ).

Συμπερασματικά φαίνεται ότι, η χαμηλή ευαισθησία του CEA το καθιστά ενδεικτικό και όχι διαγνωστικό εργαλείο στη διάκριση κακοηθών υπεζωκοτικών συλλογών. Τα σημαντικά αυξημένα επίπεδα του TNF- $\alpha$  στο πλευριτικό υγρό ασθενών με φυματίωση, υποδεικνύουν το ρόλο του στη διαφοροδιάγνωση της φυματιώδους από άλλες αιτίες υπεζωκοτικών συλλογών, αλλά και στο διαχωρισμό του διδρώματος από το εξίδρωμα, ενώ επίσης μπορεί να διακρίνει τις λεμφοκυτταρικές υπεζωκοτικές συλλογές με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα.



## 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εκατομμύρια άνθρωποι κάθε χρόνο αναπτύσσουν υπεζωκοτικές συλλογές, ως αποτέλεσμα της επιπλοκής διαφόρων νοσημάτων. Παρ' όλη την βελτίωση των διαγνωστικών μεθόδων ένα μεγάλο ποσοστό πλευριτικών συλλογών παραμένει αδιάγνωστο.

Κατά τα τελευταία χρόνια έγιναν μεγάλες προσπάθειες να ερμηνευτεί η παρουσία ορισμένων βιοχημικών παραμέτρων στο πλευριτικό υγρό, καθώς και οι μεταβολές τους, ανάλογα με την αιτία που προκάλεσε την υπεζωκοτική συλλογή.

Η παρουσία του πλευριτικού υγρού, σηματοδοτεί μια ανώμαλη παθοφυσιολογική κατάσταση, αποτέλεσμα της διαταραχής της ισορροπίας σχηματισμού-απομάκρυνσής του<sup>1</sup>.

Η υπεύθυνη νόσος συνηθέστερα βρίσκεται στους πνεύμονες ή την υπεζωκοτική κοιλότητα, μπορεί όμως να είναι εξωπνευμονική, δηλαδή να ενοχοποιείται η καρδιά (καρδιακή ανεπάρκεια), οι νεφροί (νεφρωσικό σύνδρομο), το ήπαρ (κίρρωση με ασκίτη), το πάγκρεας (οξεία παγκρεατίτιδα) κ.λ.π. Πλευριτική συλλογή έχουμε επίσης σε συστηματικές νόσους, όπως στον συστηματικό ερυθματώδη λύκο, την ρευματοειδή αρθρίτιδα, ή και σαν επακόλουθο αντίδρασης σε κάποια φάρμακα<sup>2</sup>.

Η παρουσία του πλευριτικού υγρού προσφέρει στον κλινικό γιατρό την δυνατότητα να διαγνώσει, από αυτό, την υπεύθυνη νόσο σε ένα μεγάλο ποσοστό περιπτώσεων. Με τη βοήθεια διαφόρων βιοχημικών εξετάσεων (μικροβιολογικών, βιοχημικών, κυτταρολογικών) και τη κλινική εικόνα του ασθενούς, μπορούμε να έχουμε διάγνωση στο 85% περίπου των περιπτώσεων<sup>3</sup>.

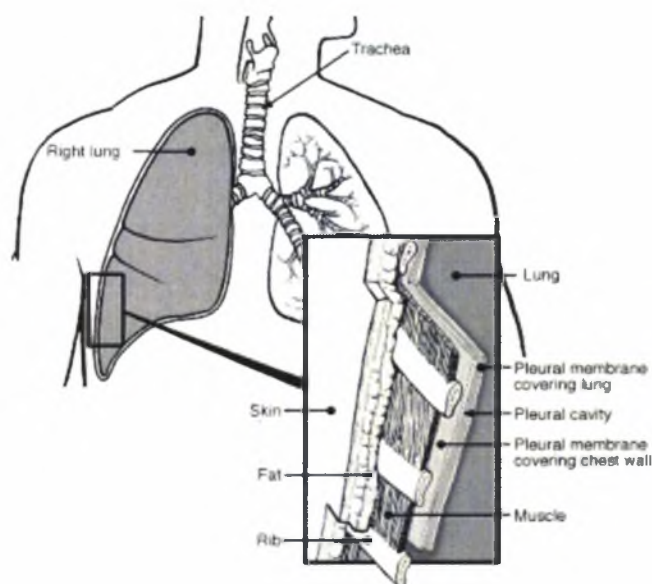
Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να ελεγχθεί η αξία των επιπέδων του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (*CEA*) και του παράγοντα νέκρωσης όγκων (*TNF- $\alpha$* ) στο πλευριτικό υγρό και το αίμα για τη διάγνωση των υπεζωκοτικών συλλογών.



### 3. ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ

#### ✓ ANATOMIA

Η υπεζωκοτική κοιλότητα αφορίζεται από το τοιχωματικό και το σπλαχνικό πέταλο του υπεζωκότα<sup>4</sup>. Τόσο ο τοιχωματικός, όσο και ο σπλαχνικός υπεζωκότας έχουν μεσοδερμική προέλευση και διαφέρουν ελάχιστα ως προς την ανατομική τους δομή<sup>5</sup>. Ο τοιχωματικός υπεζωκότας (*parietal pleura*) καλύπτει το θωρακικό τοίχωμα, το διάφραγμα και το μεσαύλιο, ενώ ο σπλαχνικός (*visceral pleura*) τον πνεύμονα (Εικόνα 1). Νευρικές απολήξεις παρατηρούνται μόνο στο τοιχωματικό πέταλο του υπεζωκότα. Τα δύο πέταλα συνέρχονται στην πύλη του πνεύμονα, όπου διέρχονται τα πνευμονικά-βρογχικά αγγεία, οι στελεχιαίοι βρόγχοι και τα λεμφαγγεία. Ο υπεζωκότας είναι ένας λεπτός, ημιδιαφανής υμένας που συνίσταται από βασική μεμβράνη, μονήρη στιβάδα μεσοθηλιακών κυττάρων, αγγεία και συνδετικό ιστό<sup>4</sup>. Ο ρόλος του είναι κεφαλαιώδης για την πνευμονική φυσιολογία, εφόσον παρέχει προστασία και επιτρέπει την διατήρηση μιας ελαστικής και έφυγρης επιφάνειας για τους πνεύμονες, ώστε να επιτελεσθεί απρόσκοπτα η λειτουργία της αναπνοής. Το υπεζωκοτικό μεσοθήλιο καλύπτεται από μία μικρή ποσότητα πλευριτικού υγρού και ποικίλλει σε μέγεθος ανάλογα με το είδος του ζωντανού οργανισμού<sup>5</sup>.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του υπεζωκότα και της υπεζωκοτικής κοιλότητας.



## Προσδιορισμός TNF- $\alpha$ & CEA στο πλευριτικό υγρό και στο αίμα ασθενών με υπεζωκοτική συλλογή

Η υπεζωκοτική κοιλότητα (*pleural cavity*) συμπεριφέρεται ως διάμεσος χώρος, εντός του οποίου ενδέχεται να συγκεντρωθούν μεγάλες ποσότητες υγρού. Φυσιολογικά, υπάρχει εντός της υπεζωκοτικής “σχιsmής”, εύρους 10-20mm, μικρή ποσότητα υγρού (0.5-1ml). Το υγρό αυτό αποτελεί, κυριολεκτικά, “υπερδιήθημα” του αίματος, είναι διαυγές, άχρωμο, περιέχει λίγα ( $1500-2000/mm^3$ ) κύτταρα (μονοπύρηννα λευκοκύτταρα, με αραιά λεμφοκύτταρα) και μικρή ποσότητα πρωτεΐνης ( $<1,5g/100ml$ )<sup>4,5</sup>.

### ✓ ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ

Ως υπεζωκοτική συλλογή χαρακτηρίζεται η αύξηση του υγρού εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας, σε ποσότητα ικανή να αποκαλυφθεί στον ακτινολογικό έλεγχο. Για τη συλλογή αυτή ευθύνονται διαταραχές στη σχέση παραγωγής-απορρόφησης του πλευριτικού υγρού. Η πρωτοπαθής νόσος αφορά συχνότερα τον υπεζωκότα και τον πνεύμονα και σπανιότερα άλλα παρακείμενα όργανα (ήπαρ, πάγκρεας, οισοφάγο). Επίσης, υπεζωκοτικές συλλογές εμφανίζονται σε συστηματικά νοσήματα, σε κακώσεις και μετά από λήψη φαρμάκων<sup>4</sup>.

Οι υπεζωκοτικές συλλογές διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες: τις εξιδρωματικές και τις διδρωματικές (Πίν.1). Οι **εξιδρωματικές** είναι το αποτέλεσμα φλεγμονής του υπεζωκότα (πλευρίτιδες) και χαρακτηρίζονται από αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδών σε μεγαλομοριακές ενώσεις (λευκώματα). Αντίθετα, στις **διδρωματικές** ο υπεζωκότας είναι αμέτοχος και η διίδρωση οφείλεται στην αύξηση της πίεσης διήθησης (υδροστατική-κolloειδωσμοτική) στα τριχοειδή του.

**Πίνακας 1:** Αίτια υπεζωκοτικών συλλογών

| <b>I. Διδρώματα</b>   |  |
|---|--|
| Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια<br>Συμπιεστική περικαρδίτιδα<br>Κίρρωση με ασκίτη<br>Νεφρωσικό σύνδρομο   | Απόφραξη άνω κοίλης<br>Υπερχορήγηση υγρών<br>Υπολευκωματιναμία<br>Περιτοναϊκές διυλίσεις<br>Μυξοίδημα  |
| <b>II. Εξιδρώματα</b>   |  |
| <b>Λοιμώξεις-Πνευμονίες</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Βακτηρίδια</li><li>• Μυκοβακτηρίδιο της φυματώσεως</li><li>• Ιοί-Μυκόπλασμα</li></ul> | <b>Ανοσιακά αίτια</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Ρευματοειδής αρθρίτιδα</li><li>• Ερυθηματώδης λύκος</li><li>• Κοκκιωμάτωση Wegener</li></ul> |





## Προσδιορισμός TNF- $\alpha$ & CEA στο πλευριτικό υγρό και στο αίμα ασθενών με υπεζωκοτική συλλογή

|   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Μύκητες</li><li>• Παράσιτα</li></ul>  | <ul style="list-style-type: none"><li>• Σύνδρομο Sjögren</li><li>• Σαρκοείδωση</li><li>• Ανοσοβλαστική Λεμφαδενοπάθεια</li></ul>  |
| <b>Οισοφαγική ρήξη Απόστημα</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• υποδιαφραγματικό</li><li>• ήπατος-σπληνός</li></ul>   | <b>Αιμοθώρακας (Ψευδο-)χυλοθώρακας Ιατρογενή</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Ακτινοβολία</li><li>• Επεμβάσεις</li><li>• Φάρμακα</li><li>• Εντερική-παρεντερική διατροφή</li></ul> |
| <b>Νεοπλάσματα</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Μεσοθηλίωμα</li><li>• Βρογχογενές</li><li>• Μαστού</li><li>• Μεταστατικό</li><li>• Λέμφωμα</li><li>• Λευχαιμία</li></ul> | <b>Άλλα αίτια</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Παγκρεατίτιδα</li><li>• Έκθεση σε αμίαντο</li><li>• Ουραιμία</li><li>• Σύνδρομο Meigs</li></ul>                                     |
| <b>Πνευμονική εμβολή</b>  |   |

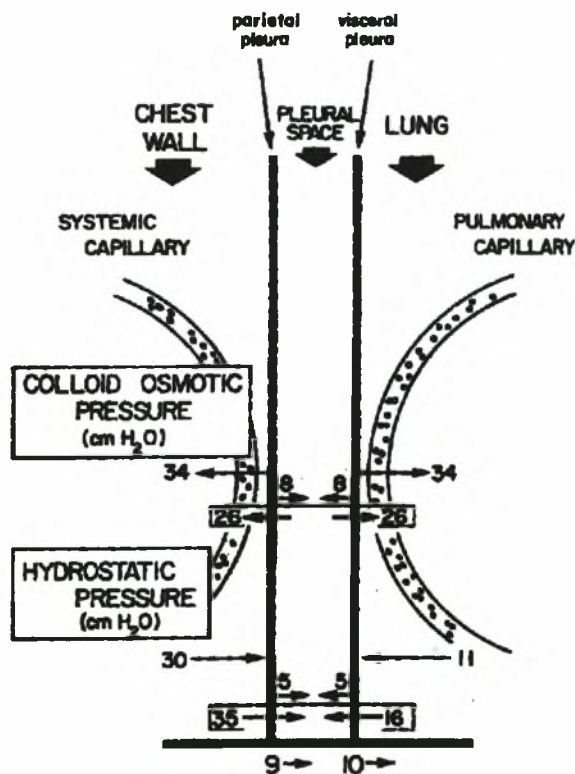
Η αιτιολογική διάγνωση των πλευρίτιδων αποτελεί δύσκολο πρόβλημα αφού σε ένα ποσοστό 20-25% δεν επιτυγχάνεται. Αντίθετα, η αιτιολόγηση μίας διδρωματικής συλλογής δεν αποτελεί συνήθως πρόβλημα. Όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων συλλογών, προηγούνται οι συμφορητικές καρδιακές ανεπάρκειες (38%) και ακολουθούν οι μικροβιακές πνευμονίες (23%), οι νεοπλασίες (15%), οι πνευμονικές εμβολές (11%), οι ιώσεις (7%) και άλλα αίτια (6%)<sup>4</sup>.

### ✓ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΕΥΡΙΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ

Για περισσότερο από εβδομήντα χρόνια η θεωρία που επικρατούσε στηριζόταν στην ισορροπία μεταξύ της υδροστατικής και της κολλοειδωσμοτικής πίεσης που υπάρχει στα πέταλα του υπεζωκότα. Η καθιερωμένη αντίληψη που θεωρούσε ότι το υγρό φυσιολογικά μετακινείται δια της υπεζωκοτικής κοιλότητας από τον τοιχωματικό υπεζωκότα, λόγω των υψηλών πιέσεων, στον σπλαχνικό υπεζωκότα που χαρακτηρίζεται από χαμηλές πιέσεις, έχει αλλάξει. Η νέα θεωρία που επικρατεί, θεωρεί ότι το υγρό φυσιολογικά έρχεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα κυρίως από τα αγγεία της συστηματικής κυκλοφορίας του τοιχωματικού υπεζωκότα, αλλά και από τα αγγεία του σπλαχνικού υπεζωκότα.



Τα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα προέρχονται από την συστηματική κυκλοφορία και έχουν, όπως όλα τα τριχοειδή, υδροστατική πίεση  $30\text{cmH}_2\text{O}$ . Οι δυνάμεις ελαστικής επαναφοράς των πνευμόνων καθιστούν την ενδοθωρακική πίεση μικρότερη της ατμοσφαιρικής κατά το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα της αναπνοής, με αποτέλεσμα η μέση τιμή της να είναι  $-5\text{cmH}_2\text{O}$ . Αυτή η διαφορά [ $30\text{cmH}_2\text{O}-(-5\text{cmH}_2\text{O})$ ] προκαλεί μία καθαρή υδροστατική πίεση  $35\text{cmH}_2\text{O}$ , η οποία τείνει να μεταφέρει υγρό από τον τοιχωματικό υπεζωκότα προς την υπεζωκοτική κοιλότητα (Εικόνα 2). Τα τριχοειδή του σπλαχνικού υπεζωκότα προέρχονται κυρίως από την πνευμονική κυκλοφορία, με υδροστατική πίεση  $11\text{cmH}_2\text{O}$ . Η διαφορά μεταξύ της υδροστατικής πίεσης του σπλαχνικού υπεζωκότα και της πίεσης της υπεζωκοτικής κοιλότητας, η οποία είναι  $16\text{cmH}_2\text{O}$  [ $11\text{cmH}_2\text{O}-(-5\text{cmH}_2\text{O})$ ], συντελεί στην ροή υγρού από τον σπλαχνικό υπεζωκότα στην υπεζωκοτική κοιλότητα (Εικόνα 2)<sup>6,7</sup>.



Εικόνα 2: Διαγραμματική παρουσίαση των αναπτυσσόμενων πιέσεων κατά το σχηματισμό και απορρόφηση του πλευριτικού υγρού.

(J. A. Paré, R. G. Fraser : Synopsis of disease of the chest, pp 66).



Η κολλοειδωσμοτική πίεση και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα είναι  $34\text{cmH}_2\text{O}$ , ενώ μέσα στην υπεζωκοτική κοιλότητα είναι μικρότερη ( $8\text{cmH}_2\text{O}$ ), καθώς μόνο ένα μικρό ποσοστό μεγάλων μορίων μπορεί να περάσει το ενδοθήλιο των τριχοειδών και να εισέλθει στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Η οσμωτική πίεση τείνει να συγκρατήσει το υγρό. Έτσι, η διαφορά πίεσης μεταξύ του τοιχωματικού υπεζωκότα και της υπεζωκοτικής κοιλότητας ( $26\text{cmH}_2\text{O}$ ) συνεπάγεται την μετακίνηση υγρού από την υπεζωκοτική κοιλότητα προς τον τοιχωματικό υπεζωκότα. Η ίδια διαφορά ( $26\text{cmH}_2\text{O}$ ) υπάρχει μεταξύ του σπλαχνικού υπεζωκότα και της υπεζωκοτικής κοιλότητας, προκαλώντας ροή υγρού από την κοιλότητα στον σπλαχνικό υπεζωκότα. Τελικά, υπάρχει μία διαφορά πιέσεων  $35\text{cmH}_2\text{O}-26\text{cmH}_2\text{O}=9\text{cmH}_2\text{O}$  που οδηγεί το υγρό από τον τοιχωματικό υπεζωκότα προς την υπεζωκοτική κοιλότητα και μία διαφορά  $26\text{cmH}_2\text{O}-16\text{cmH}_2\text{O}=10\text{cmH}_2\text{O}$ , που ωθεί το υγρό έξω από την κοιλότητα προς τον σπλαχνικό υπεζωκότα (βλ. Εικόνα 2). Η ανατομική διαφορά ανάμεσα στα τριχοειδή του σπλαχνικού και του τοιχωματικού πετάλου του υπεζωκότα είναι ο βασικός παράγοντας που δημιουργεί τη φυσική ροή του υγρού από τον τοιχωματικό στον σπλαχνικό υπεζωκότα, μέσω της υπεζωκοτικής κοιλότητας. Η απομάκρυνση του υγρού, υπό φυσιολογικές συνθήκες, γίνεται από τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα, τα οποία αποτελούν το λεμφικό σύστημα του υπεζωκότα και συνδέονται άμεσα με την υπεζωκοτική κοιλότητα<sup>6,7</sup>.

Οι απόψεις για τη φυσιολογία της υπεζωκοτικής κοιλότητας στηρίζονται σχεδόν αποκλειστικά στις διαφορές των οσμωτικών και των υδροστατικών πιέσεων στα δύο πέταλα του υπεζωκότα. Αυτή η απλουστευμένη μελέτη της διακίνησης του υγρού από την υπεζωκοτική κοιλότητα μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση του μηχανισμού δημιουργίας μίας υπεζωκοτικής συλλογής σε αρκετά νοσήματα.

### ✓ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΠΛΕΥΡΙΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ

Η παραγωγή του υπεζωκοτικού υγρού γίνεται κατά κύριο λόγο από τα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα, λόγω της μεγαλύτερης πίεσης διήθησης στη μικροκυκλοφορία του. Η διαφορά αυτή δημιουργείται από το γεγονός ότι, ενώ και τα δύο πέταλα του υπεζωκότα αιματώνονται από την συστηματική κυκλοφορία, το φλεβικό δίκτυο του τοιχωματικού καταλήγει στην άνω-κάτω κοίλη φλέβα, ενώ του σπλαχνικού, στις χαμηλότερης πίεσης πνευμονικές φλέβες.



Αλλά και η παροχέτευση του πλευρικού χώρου επιτελείται κατά κύριο λόγο από τον τοιχωματικό υπεζωκότα, μέσω ανοιγμάτων εύρους 2-12  $\mu\text{m}$  (stomata) που συνέχονται με λεμφοκόλπους (lacunae) και αυτοί με την σειρά τους με λεμφαγγεία που καταλήγουν στους λεμφαδένες του μεσαυλίου. Ανάλογα ανοίγματα δεν υφίστανται στο σπλαχνικό υπεζωκότα<sup>4</sup>.

Η παθολογική αύξηση του υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα μπορεί να οφείλεται σε έναν ή και περισσότερους από τους παρακάτω μηχανισμούς:

**1.Αύξηση της υδροστατικής πίεσης στη μικροκυκλοφορία του υπεζωκότα.** Ευθύνεται συχνά για την υπεζωκοτική συλλογή που παρατηρείται στην *καρδιακή ανεπάρκεια*.

**2.Ελάττωση της υδροστατικής πίεσης εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας (ατελεκτασία πνεύμονα).** Έχει διαπιστωθεί ότι, στην ολική ατελεκτασία πνεύμονα, η υπεζωκοτική πίεση μπορεί να κατέλθει σε επίπεδα  $< -20\text{cmH}_2\text{O}$ . Οι αρνητικές αυτές πιέσεις προκαλούν απόλυτη αύξηση της υδροστατικής πίεσης και υπεζωκοτική συλλογή.

**3.Ελάττωση της κολλοειδωσμοτικής πίεσης (υπολευκωματιναιμία, νεφρωτικό σύνδρομο).** Μόνη της σπάνια προκαλεί υπεζωκοτική συλλογή, λόγω της μεγάλης απορροφητικής ικανότητας των λεμφαγγείων. Αν όμως συνδυαστεί με την παρεμπόδιση της λεμφικής παροχέτευσης είναι δυνατόν να δημιουργηθούν μεγάλες υπεζωκοτικές συλλογές.

**4.Αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών του υπεζωκότα (πλευρίτιδα).** Αποτελεί την δεύτερη, μετά την αύξηση της υδροστατικής πίεσης, αιτία της υπεζωκοτικής συλλογής. Η διαπερατότητα των τριχοειδών αυξάνεται στις φλεγμονές του υπεζωκότα, όπου παρεμποδίζεται η παροχέτευση του υγρού που συγκεντρώνεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα με την απόφραξη των λεμφικών στομάτων.

**5.Απόφραξη του λεμφικού συστήματος από το ύψος των “στομάτων” μέχρι των μεσαυλικών λεμφαδένων.** Συχνά αίτια είναι οι νεοπλασίες, οι φλεγμονές και η ίνωση.

**6.Παθητική μετακίνηση του περιτοναϊκού υγρού μέσω διαφραγματικών ελλειμμάτων, λόγω της υφιστάμενης διαφοράς πίεσης μεταξύ περιτοναϊκής και υπεζωκοτικής κοιλότητας<sup>4,5</sup>.**



### ✓ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΛΕΥΡΙΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ

Σε κάθε υπεζωκοτική συλλογή επιβάλλεται διαγνωστική θωρακοκέντηση και ανάλυση του υγρού πλην εξαιρέσεων, όπου η διάγνωση θεωρείται δεδομένη με βάση το ιστορικό, την κλινική και ακτινολογική εικόνα. Υπάρχουν μόνο σχετικές αντενδείξεις θωρακοκέντησης (αιμορραγική διάθεση, λήψη αντιπηκτικών, μηχανικός αερισμός). Συχνά, η εξέταση του πλευριτικού υγρού προσφέρει αξιόλογες διαγνωστικές πληροφορίες ή ακόμη επιτρέπει και μία σαφή διάγνωση. Τα πιο σημαντικά κριτήρια είναι η εμφάνιση, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και τα κυτταρικά συστατικά. Για πιο ειδικές διαγνωστικές πληροφορίες, η τυπική μέτρηση της συγκέντρωσης γλυκόζης συμπληρώνεται από τον προσδιορισμό άλλων εργαστηριακών παραμέτρων (Πίν.2) και την καλλιέργεια του υγρού<sup>4,5</sup>.

#### Πίνακας 2

| Παράμετροι που εξετάζονται σε υπεζωκοτικές συλλογές |                                |
|---|--------------------------------|
| Υποχρεωτικά   | Προαιρετικά                    |
| Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά                         | Συγκέντρωση γλυκόζης           |
| Ολικές πρωτεΐνες                                    | pH                             |
| Κυτταρολογική (προσδιορισμός τύπου κυττάρων)        | Γαλακτική δεϋδρογενάση (LDH)   |
|   | Χοληστερόλη                    |
|   | Τριγλυκερίδια                  |
|   | Αμυλάση                        |
|   | Χολερυθρίνη                    |
|   | Κρεατινίνη                     |
|   | Αιματοκρίτης                   |
|   | Ανοσοϊστοχημική εξέταση        |
|   | Καρκινικοί δείκτες             |
|   | Δεαμινάση της αδενοσίνης (ADA) |
|   | Λυσοζύμη                       |
|   | Αντιπυρηνικά αντισώματα        |
|   | Ρευματοειδής παράγοντας κλπ.   |
|   | Αναζήτηση μικροοργανισμών      |
|   | Μυκοβακτηρίδιο φυματίωσης      |
|   | Χρώση κατά Gram                |
|   | Αναερόβια και αερόβια βακτήρια |
|   | Μύκητες                        |
|   | Παράσιτα                       |



Τα **μακροσκοπικά χαρακτηριστικά** του πλευριτικού υγρού αποτελούν τα πρώτα στοιχεία εκτίμησης της συλλογής (**Πίν.3**)

**Πίνακας 3:** Μακροσκοπική εκτίμηση του πλευριτικού υγρού

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b>Διαυγές αχυρόχρουν</b> | : Τα περισσότερα διδρώματα - μερικά εξιδρώματα |
| <b>Αιμορραγικό</b>        | : Νεόπλασμα - πνευμονικό έμφρακτο - κάκωση     |
| <b>Λευκό γαλακτώδες</b>   | : Εμπύημα - χυλοθώρακας - ψευδοχυλοθώρακας     |
| <b>Καφεοειδές</b>         | : Ρήξη αμοιβαδικού αποστήματος                 |
| <b>Κιτρινοπράσινο</b>     | : Ρευματοειδής αρθρίτιδα                       |
| <b>Στοιχεία τροφής</b>    | : Ρήξη οισοφάγου                               |
| <b>Ιξώδες αιμορραγικό</b> | : Μεσοθηλίωμα                                  |
| <b>Δύσοσμο</b>            | : Αναερόβιο εμπύημα                            |

Το πρώτο βήμα στην ανάλυση του υπεζωκοτικού υγρού είναι η διάκρισή του σε **εξιδρώμα** ή **διδρώμα**. Για τον σκοπό αυτό προσδιορίζεται η πρωτεΐνη και η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) ταυτόχρονα στο υπεζωκοτικό υγρό και στο αίμα. Τα εξιδρώματα έχουν τουλάχιστον ένα και τα διδρώματα κανένα από τα παρακάτω τρία κριτήρια<sup>8,9,10,11</sup>.

1. Ο λόγος των πρωτεϊνών του υπεζωκοτικού υγρού προς τις πρωτεΐνες του αίματος είναι  $> 0,5$ .
2. Η σχέση της LDH του υπεζωκοτικού υγρού προς την LDH του αίματος είναι  $> 0,6$ .
3. Η απόλυτη τιμή της LDH στο υπεζωκοτικό υγρό είναι  $> 2/3$  των ανωτέρων φυσιολογικών τιμών του πλάσματος.

#### ► **Κυτταρολογική πλευριτικού υγρού**

Η κυτταρολογική εξέταση του πλευριτικού υγρού επισφραγίζει τη διάγνωση των νεοπλασματικών συλλογών στο 50% των ασθενών. Σχεδόν όλα τα αδενοκαρκινώματα δίνουν θετική κυτταρολογική εξέταση του πλευριτικού υγρού, αλλά η ευαισθησία της εξέτασης μειώνεται στα επιδερμοειδή καρκινώματα, στη νόσο του Hodgkin και στα σαρκώματα. Σε μεγάλο ποσοστό ασθενών με αρνητική κυτταρολογική εξέταση, ενδέχεται η υπεζωκοτική συλλογή να μην οφείλεται σε νεοπλασματική διήθηση του υπεζωκότα, αλλά σε άλλα αίτια (απόφραξη λεμφαγγείων, ατελεκτασία πνεύμονα)<sup>4</sup>.



### ➤ Αριθμός και τύπος λευκοκυττάρων

Ο συνολικός αριθμός λευκών του πλευριτικού υγρού δεν προσφέρεται ιδιαίτερα για διαφορική διάγνωση. Οι περισσότερες διδρωματικές συλλογές έχουν αριθμό λευκών  $<1000$  κύτταρα/ $\text{mm}^3$ , ενώ τα περισσότερα εξιδρώματα έχουν λευκά  $>1000$  κύτταρα/ $\text{mm}^3$ . Αύξηση των λευκών ( $>10.000$  κύτταρα/ $\text{mm}^3$ ) παρατηρείται ιδιαίτερα στις παραπνευμονικές συλλογές, αλλά επίσης και σε άλλες παθήσεις, όπως στην πνευμονική εμβολή, στην παγκρεατίτιδα και στον συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο<sup>5</sup>.

Αντίθετα με τον αριθμό των λευκών, ο τύπος τους έχει καθοριστική σημασία στη διάκριση των πλευρίτιδων. Έτσι, σε οξείες καταστάσεις που προσβάλλουν τον υπεζωκότα προέχουν τα ουδετερόφιλα. Εάν συνυπάρχουν παρεγχυματικές διηθήσεις, τότε οι πιθανότερες διαγνώσεις είναι η παραπνευμονική συλλογή ή η πνευμονική εμβολή. Εάν δεν συνυπάρχουν πνευμονικά διηθήματα, οι πιθανότερες διαγνώσεις είναι πνευμονική εμβολή, ίωση, νόσος του γαστρεντερικού ή φυματιώδης πλευρίτιδα. Όταν κυριαρχούν τα μονοπύρηνια, ο ασθενής πάσχει από μία χρόνια νόσο που προσβάλλει τον υπεζωκότα. Η κακοήθεια, η πνευμονική εμβολή, η φυματίωση ή η πρόσφατη αορτοστεφανιαία παράκαμψη είναι οι πιθανότερες διαγνώσεις. Εάν ο ασθενής εμφανίζει υγρό πλούσιο σε μικρά λεμφοκύτταρα, οι τρεις πιθανότερες διαγνώσεις είναι η φυματίωση, η κακοήθεια και η αορτοστεφανιαία παράκαμψη<sup>4,5</sup>.

Συχνά, στο πλευριτικό υγρό απαντώνται ηωσινόφιλα σε ποσοστό  $>10\%$  (**ηωσινοφιλική πλευρίτιδα**). Η πιθανότερη εξήγηση είναι η παρουσία αέρα ή αίματος στην υπεζωκοτική κοιλότητα<sup>4</sup>.

### ➤ Στάθμη γλυκόζης

Τα επίπεδα γλυκόζης στα διδρώματα και στα περισσότερα εξιδρώματα είναι παρόμοια με αυτά του αίματος. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη ( $<60\text{mg}/100\text{ml}$ ) χαρακτηρίζει όλες τις παραπνευμονικές συλλογές και τη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Επίσης χαμηλή τιμή γλυκόζης απαντάται ενίοτε στις νεοπλασματικές (30%) και στις φυματιώδεις (20%) πλευρίτιδες. Συλλογές που συνοδεύουν πνευμονίες με τιμές γλυκόζης  $<40\text{mg}/\text{dL}$ , συνήθως σχετίζονται με βακτηριακή λοίμωξη. Οι χαμηλότερες τιμές γλυκόζης ( $<10\text{mg}/\text{dL}$ ) απαντώνται στη ρευματοειδή πλευρίτιδα και στο εμπύημα<sup>4,5</sup>.



### ➤ pH πλευριτικού υγρού

Η τιμή του pH στο υπεζωκοτικό υγρό υγιών ατόμων είναι 7.6, υψηλότερη δηλαδή της τιμής του pH του αίματος. Αν και δεν συνιστάται η μέτρηση ρουτίνας του πλευριτικού pH, η παράμετρος αυτή είναι χρήσιμη στις περιπτώσεις παραπνευμονικής συλλογής. Χαμηλή τιμή pH (<7.3), σε συνδυασμό με φυσιολογικές τιμές pH αίματος απαντάται στις συλλογές εκείνες που χαρακτηρίζονται από χαμηλή τιμή γλυκόζης και υψηλή LDH (έντονη φλεγμονή του υπεζωκότα). Σε οισοφαγική ρήξη το pH είναι συνήθως χαμηλότερο του 6, εξαιτίας της έντονης φλεγμονής του μεσαυλικού και υπεζωκοτικού χώρου, ενώ στη ρευματοειδή πλευρίτιδα το pH είναι σχεδόν πάντοτε χαμηλότερο από 7.2<sup>4,5</sup>.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, φαίνεται η αναγκαιότητα της εκτίμησης όλων αυτών των δεικτών (λευκά-τύπος, γλυκόζη, pH) σε κάθε περίπτωση εξιδρωματικής συλλογής. Οι τιμές των ανωτέρω δεικτών, σε συνδυασμό πάντοτε με την κλινική εικόνα και το ιστορικό, δίνουν τις κατευθυντήριες γραμμές για πιο εξειδικευμένες αναλύσεις, όπως:

### ➤ Στάθμη γαλακτικής δεϋδρογενάσης (LDH)

Το πλευριτικό LDH είναι ένας αξιόπιστος δείκτης υπεζωκοτικής φλεγμονής και αυτή η μέτρηση πρέπει να γίνεται κάθε φορά που παρακεντάται ασθενής με αδιάγνωστη πλευριτική συλλογή<sup>5</sup>.

### ➤ Αμυλάση

Όταν η τιμή της αμυλάσης του πλευριτικού υγρού υπερβαίνει την αντίστοιχη του αίματος, η διαφορική διάγνωση περιορίζεται σε παγκρεατική νόσο, σε ρήξη του οισοφάγου ή σε υπεζωκοτική κακοήθεια.

Η μέτρηση ρουτίνας της αμυλάσης είναι οικονομικά ασύμφορη σε σχέση με το προσδοκώμενο κλινικό όφελος. Σήμερα, συστήνεται να μετράται η αμυλάση πλευριτικού υγρού μόνο στα περιστατικά, στα οποία υπάρχει υπόνοια από το ιστορικό για οξεία παγκρεατίτιδα, χρόνια παγκρεατική νόσο ή ρήξη οισοφάγου<sup>4,5</sup>.





➤ **Δεαμινάση της αδενοσίνης (ADA) και ιντερφερόνη γ (IFN-γ)**

Η μέτρηση της ADA στο πλευριτικό υγρό είναι διαγνωστικά χρήσιμη, εφόσον τείνει να είναι υψηλότερη στο φυματιώδες πλευριτικό υγρό σε σύγκριση με άλλα πλευριτικά εξιδρώματα. Άλλες νοσολογικές καταστάσεις που αυξάνουν την στάθμη της ADA στο πλευριτικό υγρό είναι το εμπύημα και η ρευματοειδής αρθρίτιδα<sup>4,5</sup>.

Πρόσφατα, και η ποσοτική εκτίμηση της ιντερφερόνης γ στο πλευριτικό υγρό χρησιμοποιείται με ασφάλεια, με σκοπό να διακρίνει τη φυματιώδη από τη μη φυματιώδη εξιδρωματική πλευρίτιδα. Σχετικές μετρήσεις δείχνουν, ότι η στάθμη της ιντερφερόνης γ στο πλευριτικό υγρό αυξάνεται στη φυματιώδη πλευρίτιδα<sup>5</sup>.

➤ **Τριγλυκερίδια**

Η μεγάλη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων (>110mg/dL) συνηγορεί υπέρ της παρουσίας χυλοθώρακα. Καθώς οι χυλώδεις συλλογές δεν έχουν απαραίτητα γαλακτώδη εμφάνιση, τα τριγλυκερίδια προσδιορίζονται σε κάθε υπεζωκοτική συλλογή αγνώστου αιτιολογίας<sup>6</sup>.

➤ **Αιματοκρίτης**

Όταν η τιμή του αιματοκρίτη στο πλευριτικό υγρό υπερβαίνει το 50% της τιμής του αιματοκρίτη του αίματος, τότε χαρακτηρίζεται ως αιμοθώρακας και χρήζει άμεσης χειρουργικής αντιμετώπισης. Αν ο αιματοκρίτης είναι μεγαλύτερος του 1%, τότε το υγρό θεωρείται αιμορραγικό (πνευμονικό έμφρακτο, νεοπλασία, κάκωση), ενώ όταν είναι μικρότερος δεν αξιολογείται (αποδίδεται στη θωρακοκέντηση)<sup>4</sup>.

➤ **Ανοσοϊστοχημική εξέταση**

Η βασική χρήση των ανοσοϊστοχημικών μελετών στα κύτταρα του πλευριτικού υγρού αποσκοπεί στη διάκριση μεταξύ του μεταστατικού αδενοκαρκινώματος και του κακοήθους μεσοθηλιώματος. Όταν χρησιμοποιείται η ανοσοϊστοχημεία γι' αυτόν τον σκοπό, πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια σειρά αντισωμάτων .

Οι καλύτεροι δείκτες για το αδενοκαρκίνωμα φαίνεται ότι είναι το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA), και οι δείκτες **Leu-M1**, **B72.3**, **Ber-EP4** και **BG-8**, ενώ για το μεσοθηλίωμα, η **καλρετινίνη** και η **κυτοκερατίνη 5/6**<sup>5</sup>.



#### ► Καρκινικοί δείκτες στο πλευριτικό υγρό

Πολυάριθμοι καρκινικοί δείκτες έχουν μελετηθεί στο πλευριτικό υγρό, όπως οι CEA, AFP, CA 15-3, CA 19-9, CA 72-4, τεμάχια κυροκερατίνης 19, σιαλικό αντιγόνο, αντιγόνο επιδερμοειδούς καρκινώματος και ενολάση, για τη διάγνωση της κακοήθους πλευρίτιδας. Γενικά, η χρήση των καρκινικών δεικτών για τη διάγνωση του πλευριτικού υγρού δεν συνιστάται. Αν και οι μέσες στάθμες των περισσότερων καρκινικών δεικτών βρίσκονται αυξημένες στους ασθενείς με κακοήθη πλευρίτιδα, σε σύγκριση με όσους πάσχουν από καλοήθη πλευρίτιδα, υπάρχει πάντοτε μια επικάλυψη στις τιμές<sup>5</sup>.

### 4. ΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ

Η υπεζωκοτική συλλογή ανευρίσκεται σε ποσοστό περίπου 10% των ασθενών της εσωτερικής παθολογίας, και η κύρια αιτία αυτών, σε ποσοστό 30-40% είναι η καρδιακή ανεπάρκεια (Πίν.4). Από τις υπεζωκοτικές συλλογές μη καρδιακής αιτιολογίας, οι *παραπνευμονικές συλλογές* είναι οι συχνότερες με ποσοστό 48%, από τις οποίες το 75% είναι βακτηριακής και το 25% ιογενούς προέλευσης.

Πίνακας 4<sup>12</sup>

| Η κατά προσέγγιση ετήσια επίπτωση των διαφόρων τύπων υπεζωκοτικής συλλογής στις ΗΠΑ |           |         |   |
|---|-----------|---------|---|
| Αιτιολογία  | Αριθμός   | Ποσοστό | Ποσοστό συλλογών μη καρδιακής αιτιολογίας |
| Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια   | 500.000   | 37,5    |   |
| Άλλα αίτια  |           | 63,5    |   |
| Πνευμονία   | 400.000   |         | 48.0                                      |
| Κακοήθεις παθήσεις  | 200.000   |         | 24.0                                      |
| Πνευμονική εμβολή   | 150.000   |         | 18.0                                      |
| Κίρρωση με ασκίτη   | 50.000    |         | 6.0                                       |
| Παθήσεις του γαστρεντερικού   | 25.000    |         | 3.0                                       |
| Νοσήματα του κολλαγόνου   | 6.000     |         | 0,7                                       |
| Φυματίωση   | 2.500     |         | 0,3                                       |
| Αμιάντωση   | 2.000     |         | 0,3                                       |
| Μεσοθηλίωμα   | 1.500     |         | 0,2                                       |
| Σύνολο  | 1.337.000 | 100%    | 100%                                      |



Οι **κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές** ακολουθούν σε ποσοστό 24% των περιπτώσεων, από τις οποίες περισσότερες από τις μισές οφείλονται σε καρκίνο των πνευμόνων ή του μαστού. Η υπεζωκοτική συλλογή οφείλεται σε **πνευμονική εμβολή** σε ποσοστό 18% των περιπτώσεων μη καρδιακής αιτιολογίας, σε **κίρρωση ήπατος** σε ποσοστό 6% και σε **παθήσεις του γαστρεντερικού**, κυρίως παγκρεατίτιδα, σε ποσοστό 3% των περιπτώσεων. Πολλές άλλες πιθανές αιτίες, αν και εξαιρετικά σπάνιες, καταλαμβάνουν αξιόλογο χώρο στη διαφορική διάγνωση.

#### ⇒ Χαρακτηριστικά πλευριτικού υγρού σε παθολογικές καταστάσεις

Ένα μεγάλο φάσμα παθήσεων, όπως η **φυματίωση**, η **κακοήθεια**, η **συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια**, η **παραπνευμονική συλλογή** και η **ρευματοειδή αρθρίτιδα** που αναλύονται παρακάτω, συνοδεύεται από την εμφάνιση υπεζωκοτικής συλλογής.

#### ✓ Φυματιώδης Πλευρίτιδα

Η φυματίωση θεωρείται μία λοιμώδης νόσος οφειλόμενη στο Μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης (*Mycobacterium tuberculosis*). Προσβάλλει κυρίως τους πνεύμονες και σπανιότερα άλλα μεμονωμένα όργανα.

Η επικράτηση και η ροπή της φυματίωσης σε μία κοινωνία καθορίζεται από τους επιδημιολογικούς δείκτες (Πίν.5), οι οποίοι αφορούν αριθμούς θανάτων, νοσημάτων και μόλυνσης.

#### Πίνακας 5

| Επιδημιολογικοί Δείκτες Φυματίωσης     |   |
|--|---|
| Θνησιμότητα:                           | ετήσιος αριθμός θανάτων από φυματίωση ανά 100.000 άτομα           |
| Επίπτωση:                              | ο αριθμός των νέων νοσησεων ετησίως, ανά 100.000 άτομα            |
| Φυματινικός δείκτης:                   | το ποσοστό των ατόμων που έχουν μολυνθεί                          |
| Ετήσιος δείκτης φυματινικής μόλυνσης:  | το ποσοστό της ετήσιας μεταβολής του φυματινικού δείκτη           |
| Ετήσιος κίνδυνος φυματινικής μόλυνσης: | το ποσοστό των ατόμων που μολύνονται κατά την διάρκεια ενός έτους |



Για να θεωρηθεί η φυματίωση εκριζωθείσα, θα πρέπει η επίπτωση να είναι  $<0.1$  ανά 100.000 άτομα και ο ετήσιος κίνδυνος μόλυνσης στο γενικό πληθυσμό  $<0.1\%$ . Σήμερα, οι θάνατοι από τη φυματίωση εξακολουθούν να είναι περισσότεροι, σε σχέση με τους θανάτους από κάθε άλλο λοιμώδες νόσημα<sup>4</sup>.

Η φυματιώδης πλευρίτιδα προσβάλλει κυρίως νέους ασθενείς, ενώ είναι δύο φορές συχνότερη στους άνδρες παρά στις γυναίκες. Ωστόσο, σήμερα επικρατεί μία τάση ανάπτυξης φυματιώδους υπεζωκοτικής συλλογής σε μεγαλύτερες ηλικιακά ομάδες.

Το πλευριτικό υγρό στη φυματιώδη πλευρίτιδα είναι διαυγές, ορώδες και στο 90% των περιπτώσεων τα επίπεδα των λευκωμάτων είναι  $>3.0\text{g/dL}$ . Το pH είναι σχεδόν πάντοτε  $<7.40$  και στο 60% των ασθενών η τιμή της γλυκόζης είναι χαμηλότερη από  $60\text{mg}/100\text{mL}$ . Η κυτταρολογική εξέταση είναι θετική και ο αριθμός των κυττάρων στο 75% είναι  $>1000$  λευκοκύτταρα (κυρίως λεμφοκύτταρα). Το ειδικό βάρος του πλευριτικού υγρού είναι  $>1016$ , ενώ διαγνωστικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν η απαμινάση της αδενοσίνης ( $>40\text{U/L}$ ) και η ιντερφερόνη  $\gamma$  ( $>10\text{U/mL}$ )<sup>6,13</sup>.

### ✓ Κακοήθεια

Οι κακοήθειες υπεζωκοτικές συλλογές προκαλούνται κυρίως από αιματογενείς ή λεμφογενείς μεταστάσεις από εξωθωρακικά πρωτοπαθή νεοπλάσματα ή από άμεση επέκταση του όγκου από παρακείμενα όργανα. Οι πιο συχνοί πρωτοπαθείς όγκοι είναι το βρογχογενές καρκίνωμα (10-50%) και ο καρκίνος του μαστού (20-50%), ενώ ακολουθούν τα λεμφώματα και ο καρκίνος των ωοθηκών. Στο 20-50% των περιπτώσεων, ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εντοπιστεί. Ωστόσο, κάθε κακοήθης όγκος μπορεί δυνητικά να δώσει μετάσταση στον υπεζωκότα. Υπεζωκοτική συλλογή αναπτύσσεται στο 8-15% των ασθενών με βρογχογενή καρκίνο, ποσοστό που μπορεί να φτάσει το 27% σε μικροκυτταρικά και το 50% σε μεταστατικά καρκινώματα. Ποσοστό 5-33% των κακοηθών λεμφωμάτων συνοδεύονται από υπεζωκοτική συλλογή, ενώ σε ποσοστό 43% αποτελεί το πρώτο σύμπτωμα των μεταστάσεων σε ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού<sup>4</sup>.

Οι υπεζωκοτικές συλλογές που οφείλονται σε κακοήθεια είναι εξιδρωματικές και σε εξαιρετικές περιπτώσεις μπορούν να χαρακτηρισθούν διϊδρωματικές (Πίν.6).



**Πίνακας 6:** Χαρακτηριστικά των νεοπλασματικών υπεζωκοτικών συλλογών

| Νεοπλασματικές Υπεζωκοτικές Συλλογές  |                              |  |
|---------------------------------------|------------------------------|--|
| Νόσος                                 | Εμφάνιση                     | Συγκέντρωση Λευκώματος<br>Εξίδρωμα: >30g/L<br>Διίδρωμα: <30g/L |
| Διάχυτο κακόηθες μεσοθηλίωμα          | Ορώδες, αιμορραγικό          | Εξίδρωμα   |
| Μεταστατικός εξωθωρακικός όγκος       | Ορώδες, αιμορραγικό, χυλώδες | Εξίδρωμα   |
| Βρογχογενής καρκίνος                  | Ορώδες, αιμορραγικό, χυλώδες | Εξίδρωμα   |
| Λέμφωμα και λευχαιμία                 | Ορώδες, αιμορραγικό, χυλώδες | Εξίδρωμα, διίδρωμα   |
| Εντοπισμένα νεοπλάσματα του υπεζωκότα | Ορώδες                       | Εξίδρωμα, διίδρωμα   |
| Σάρκωμα Kaposi (AIDS)                 | Αιμορραγικό                  | Εξίδρωμα   |
| Νεοπλάσματα του θωρακικού τοιχώματος  | Ορώδες, αιμορραγικό          | Εξίδρωμα   |
| Συνοδός υπεζωκοτική συλλογή σε όγκους | Ορώδες                       | Εξίδρωμα, διίδρωμα   |

Το πλευριτικό υγρό είναι ορώδες, αιμορραγικό και στο 90% των περιπτώσεων η συγκέντρωση των λευκωμάτων είναι >3.0g/dL. Η κυτταρολογική εξέταση είναι θετική στο 30-40% και ο αριθμός των κυττάρων στο 40% των ασθενών είναι περίπου 1000 λευκοκύτταρα. Τα επίπεδα της γλυκόζης σπάνια είναι χαμηλότερα από 60mg/100mL και οι ασθενείς συχνά παρουσιάζουν οξέωση με pH<7.30. Η απαμινάση της αδενοσίνης παρουσιάζει μέση τιμή 21U/L, ενώ το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο κυμαίνεται σε στάθμη μεγαλύτερη των 10ng/mL<sup>6</sup>.

#### ✓ Συμφορητική Καρδιακή Ανεπάρκεια

Η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια είναι η πιο συχνή αιτία υπεζωκοτικών συλλογών. Η χαρακτηριστική υπεζωκοτική συλλογή που σχετίζεται με καρδιακή ανεπάρκεια έχει τα χαρακτηριστικά διιδρώματος.

Το πλευριτικό υγρό είναι διαυγές αχρρόχρουν και στο 75% των περιπτώσεων τα επίπεδα των λευκωμάτων είναι χαμηλότερα από 3.0g/dL. Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων είναι χαμηλότερος από 1000/ $\mu$ L (κυρίως μονοπύρηνα), ενώ η τιμή του pH είναι παρόμοια με αυτή του αίματος. Το ειδικό βάρος στο 90% των ασθενών είναι



<1016. Η τιμή της γαλακτικής δεϋδρογενάσης είναι <200U/L, ενώ αυτή της χοληστερόλης <60mg/dL<sup>6,14,15,16</sup>.

Η θεραπεία αυτών των υπεζωκοτικών συλλογών συνίσταται στην αντιμετώπιση της καρδιακής ανεπάρκειας.

### ✓ Παραπνευμονική Συλλογή

Παραπνευμονική χαρακτηρίζεται η συλλογή πλευριτικού υγρού στον υπεζωκοτικό χώρο που συνοδεύει βακτηριακή πνευμονία, απόστημα ή βρογχεκτασίες. Η βακτηριακή λοίμωξη του υπεζωκότα καταλήγει στην εμφάνιση υπεζωκοτικής συλλογής στο 40% των περιπτώσεων. Στους ενήλικες, ανευρίσκονται συχνά αναερόβια βακτήρια ή συνδυασμός αερόβιων και αναερόβιων βακτηρίων<sup>4</sup>.

Στο εξιδρωματικό στάδιο της υπεζωκοτικής συλλογής, το υγρό χαρακτηρίζεται από χαμηλή τιμή LDH (<500IU/L) και πολυμορφοπύρηνων, ενώ η τιμή της γλυκόζης και του pH δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη απόκλιση από τα φυσιολογικά επίπεδα.

Η ανάπτυξη υπεζωκοτικής συλλογής σχετίζεται με την χρονική διάρκεια που παραμένει χωρίς θεραπεία η πνευμονία. Αν δεν εφαρμοσθεί έγκαιρα κατάλληλη αντιβιοτική αγωγή, η λοίμωξη προσβάλλει τον υπεζωκότα και μικρόβια εισχωρούν στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Η μακροσκοπική εμφάνιση του πυώδους πλευριτικού υγρού και η δυσσομία (λόγω αναερόβιας λοίμωξης) σηματοδοτούν την παρουσία εμπυήματος. Στη φάση αυτή, το υγρό χαρακτηρίζεται από χαμηλή τιμή γλυκόζης (<35mg/dL) και pH<7.2. Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων είναι >10.000/ $\mu$ L, ενώ τα επίπεδα LDH είναι υψηλότερα από 1000IU/L. Στο 95% των αναερόβιων πνευμονιών, η καλλιέργεια του πλευριτικού υγρού είναι θετική<sup>17,18</sup>.

### ✓ Ρευματοειδής Αρθρίτιδα

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα αποτελεί μία αυτοάνοση πάθηση, με μεγαλύτερη συχνότητα στους άνδρες παρά στις γυναίκες. Η υπεζωκοτική συλλογή θεωρείται η συχνότερη εκδήλωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας από το θώρακα και συναντάται στο 3-5% των περιπτώσεων, συνήθως αρκετά χρόνια μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων της αρθρίτιδας.



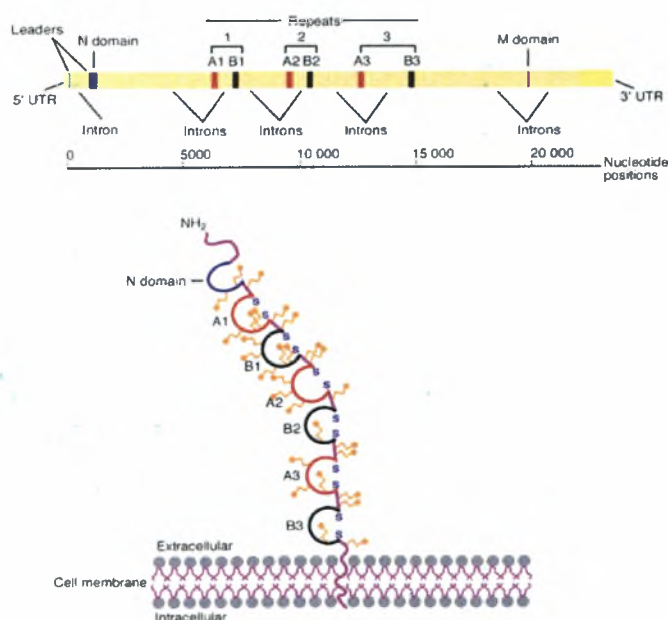
Το πλευριτικό υγρό είναι θολερό με μία κιτρινοπράσινη χροιά. Τα χαρακτηριστικά της υπεζωκοτικής συλλογής είναι η πολύ χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης (<30mg/dL), το χαμηλό pH (<7.2), η αυξημένη συγκέντρωση LDH (>700U/L), η αυξημένη τιμή ρευματοειδούς παράγοντα (>1:320) και τα χαμηλά επίπεδα συμπληρώματος. Στο πλευριτικό υγρό δεσπόζουν τα λεμφοκύτταρα, ενώ τα επίπεδα των λευκωμάτων είναι >3.0g/dL και το ειδικό βάρος του υγρού είναι >1016<sup>6,7,19</sup>.

Η πορεία της ρευματοειδούς πλευρίτιδας ποικίλλει, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρείται αυτόματη απορρόφηση.

## 5. ΚΑΡΚΙΝΟΕΜΒΡΥΪΚΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ (CEA) ΚΑΙ ΟΓΚΟΝΕΚΡΩΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (TNF- $\alpha$ )

### A. CarcinoEmbryonic Antigen (CEA).

Το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA) είναι μία γλυκοπρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και αλληλεπιδρά με τα συστατικά του κυτταροσκελετού (Εικόνα 3)<sup>20,21,22</sup>. Αποτελείται από μία μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα μοριακού βάρους 200kDa, ενώ το γονίδιο που την κωδικοποιεί εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 (Εικόνα 3)<sup>23,24</sup>.



Εικόνα 3: Διαγραμματική απεικόνιση του γονιδίου που κωδικοποιεί το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο στον άνθρωπο (*Expert Reviews in Molecular Medicine*).



Η έκφρασή της έχει παρατηρηθεί κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής από το ενδοδερμικό επιθήλιο, ενώ μετεμβρυϊκά από διάφορους όγκους (ορθού, μαστών, ωοθηκών, πνευμόνων κτλ.)<sup>25</sup>.

Ο ρόλος του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου είναι ιδιαίτερα σημαντικός στην ανίχνευση (επιλογή των καρκινοπαθών στον ασυμπτωματικό πληθυσμό), την διάγνωση, την πρόγνωση, τον εντοπισμό και τη θεραπεία. Αποτελεί χρήσιμο βιολογικό δείκτη για τον καρκίνο του πνεύμονα. Τα επίπεδά του είναι αυξημένα στα 2/3 των ασθενών με μη μικρο-κυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και στο 1/3 ασθενών με μικρο-κυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Ο προσδιορισμός του θεωρείται διαγνωστικό εργαλείο για τις κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές, εφόσον στο 40-70% αυτών των ασθενών, το πλευριτικό υγρό της πρώτης παρακέντησης είναι θετικό για τις δοκιμασίες του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου<sup>26,27</sup>.

Η ανίχνευσή του στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό φαίνεται να χρησιμεύει στην διάγνωση της μινιγγικής καρκινωμάτωσης, ενώ η παρουσία του στο γαστρικό υγρό είναι χρήσιμη στην αναγνώριση ασθενών με υψηλό κίνδυνο καρκίνου του στομάχου<sup>28</sup>.

## **B. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).**

Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (*TNF- $\alpha$* ) είναι ένα μικρό πολυπεπτιδίο μοριακού βάρους 17kDa, μέλος της οικογένειας των κυτταροκινών, με πλειοτροπική επιρροή στις βιολογικές και ανοσολογικές διαδικασίες. Ανακαλύφθηκε το 1975 ως συστατικό του ορού κατά την διάρκεια νέκρωσης όγκου από βακτηριακές ενδοτοξίνες. Μελετήθηκε επίσης ως παράγοντας υπεύθυνος για την καχεξία στις χρόνιες μολύνσεις (**Beutler and Cerami, 1988**)<sup>29</sup>.

Παράγεται από ενεργοποιημένα μακροφάγα, τα T-κύτταρα και τα NK-κύτταρα, ενώ μία ποικιλία μολυσματικών παραγόντων και παραγόντων φλεγμονής επάγουν τη βιοσύνθεσή του (Πίν.7). Τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των Gram<sup>-</sup> βακτηρίων, ιδιαίτερα οι λιποσακχαρίτες (LPS), επάγουν την παραγωγή του από τα μακροφάγα.





**Πίνακας 7:** Χαρακτηριστικά και ιδιότητες του TNF-alpha.

|                       |  |
|-----------------------|--|
| Γονίδιο:              | 4 Εξώνια   |
| Χρωμόσωμα:            | 6  |
| Μοριακό βάρος:        | 17kDa  |
| Κυτταρική πηγή:       | Μακροφάγα, T και B λεμφοκύτταρα,<br>ινοβλάστες, αστροκύτταρα |
| Εξωγενείς επαγωγείς:  | Μικροβιακοί και ιικοί παράγοντες                             |
| Ενδογενείς επαγωγείς: | IL-1, IL-2, IL-4, IFN, νευροδιαβιβαστές                      |

Η βιολογική δράση του TNF-alpha περιλαμβάνει:

**-Ρύθμιση της αύξησης των καρκινικών κυττάρων:** Ο TNF-a διαθέτει μία επιλεκτική τοξικότητα για τα καρκινικά κύτταρα και τα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιό.

**-Φλεγμονώδη δράση:** Ο TNF-a ενεργοποιεί τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα ηωσινόφιλα. Ρυθμίζει την παραγωγή των αντισωμάτων από τα Β-κύτταρα, ενώ ενεργοποιεί τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα.

**-Μεταβολική δράση:** Ο TNF-a παρεμποδίζει την δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και την έκφραση των γονιδίων των λιποκυττάρων. Σε συνεργασία με άλλες κυτταροκίνες εμπλέκεται σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα, ενώ παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση νοσημάτων. Χαμηλά επίπεδα TNF-a στον ορό έχουν περιγραφεί σε παρασιτικές λοιμώξεις, τον καρκίνο και την απόρριψη μοσχεύματος<sup>30</sup>.



## 6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να εκτιμηθεί κατά πόσον τα επίπεδα των  $TNF-\alpha$  και  $CEA$  στο πλευριτικό υγρό και στον ορό, θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη διαφοροδιάγνωση των υπεζωκοτικών συλλογών.



## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### ⇒ Συλλογή και διατήρηση των δειγμάτων

Από κάθε ασθενή λαμβάνονταν το πλευριτικό υγρό της πρώτης παρακέντησης και ταυτόχρονα 10mL αίματος, τα οποία υποβάλλονταν σε φυγοκέντρηση στις **1500rpm για 10 λεπτά στους 4°C**. Κατόπιν τοποθετούνταν στους **-80 °C** έως τη στιγμή της ανάλυσής τους.

### ⇒ Προσδιορισμός TNF- $\alpha$ και CEA στο πλευριτικό υγρό και στον ορό ασθενών με υπεζωκοτική συλλογή

#### ➤ Ασθενείς

Μελετήθηκαν συνολικά 124 ασθενείς (**89 άνδρες και 35 γυναίκες**) που νοσηλεύτηκαν στη Πνευμονολογική, Πανεπιστημιακή/Παθολογική, Παθολογική/Ε.Σ.Υ. και Καρδιολογική κλινική του Π.Π.Γ.Ν.Α. για διαγνωστική διερεύνηση υπεζωκοτικής συλλογής κατά το χρονικό διάστημα *Φεβρουάριο 2004* έως *Απρίλιο 2005*. Σε όλους τους ασθενείς συμπληρώθηκε κοινό πρωτόκολλο (**Εικόνα 4**) στο οποίο καταγράφηκαν τα ακόλουθα:

- 1- Η αιτία εισόδου, ο εντοπισμός της υπεζωκοτικής συλλογής (Αριστερά, Δεξιά, Άμφω) και η τελική διάγνωση.
- 2- Η βιοψία υπεζωκότα, για τις περιπτώσεις όπου υπήρχε ένδειξη.
- 3- Η κυτταρολογική του πλευριτικού υγρού.
- 4- Η μικροβιολογική εξέταση του πλευριτικού υγρού.
- 5- Η καλλιέργεια του πλευριτικού υγρού.
- 6- Η γενική αίματος (αριθμός και τύπος λευκών αιμοσφαιρίων, T.K.E.).
- 7- Ο προσδιορισμός του σακχάρου, LDH, ολ. λευκωμάτων και ολικής ADA στο πλευριτικό υγρό και το αίμα.

Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε πέντε ομάδες σύμφωνα με την τελική διάγνωση (**Πίν.8**):



**Πίνακας 8:** Αιτιολογία υπεζωκοτικών συλλογών (n=124).

| Αιτία                  | Αριθμός ασθενών | %    |
|------------------------|-----------------|------|
| Διδρώματα              | 27              | 21.9 |
| Εξιδρώματα             | 97              | 78.1 |
| Παραπνευμονική Συλλογή | 15              | 11.4 |
| Φυματίωση              | 25              | 20.3 |
| Κακοήθεια              | 57              | 46.3 |
| Καρκίνος Πνεύμονα      | 28              | 22.7 |
| Άλλα                   | 29              | 23.6 |

✓ **Φυματίωση:** 25 ασθενείς (17 άνδρες και 8 γυναίκες) ηλικίας 19 έως 84 ετών (μέση ηλικία  $55 \pm 16,51$  έτη).

Η τελική διάγνωση τέθηκε με την απομόνωση του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης: **α)** στη καλλιέργεια πτυέλων και πλευριτικού υγρού, **β)** με τη χρώση Zielh Neelsen και **γ)** με βιοψία υπεζωκότα.

✓ **Κακοήθεια:** 57 ασθενείς (39 άνδρες και 18 γυναίκες) ηλικίας 27 έως 92 ετών (μέση ηλικία  $70 \pm 11$  έτη).

Η διάγνωση τέθηκε σε όλους τους ασθενείς με την θετική κυτταρολογική εξέταση του πλευριτικού υγρού.

✓ **Πνευμονία:** 15 ασθενείς (12 άνδρες και 3 γυναίκες) ηλικίας 21 έως 86 ετών (μέση ηλικία  $50 \pm 22$  έτη).

Σε όλες τις περιπτώσεις το πλευριτικό υγρό παρουσίαζε επικράτηση των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων. Η καλλιέργεια του πλευριτικού υγρού για κοινά βακτηρίδια ήταν αρνητική σε όλους τους ασθενείς.

✓ **Συμφορητική Καρδιακή Ανεπάρκεια (Διίδρωμα):** 27 ασθενείς (21 άνδρες και 6 γυναίκες) ηλικίας 46 έως 88 ετών (μέση ηλικία  $70 \pm 9$  έτη).

Η διάγνωση βασίστηκε στο ιστορικό των ασθενών, στην κλινική εικόνα και τα αντικειμενικά ευρήματα της συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας, καθώς και τα εργαστηριακά ευρήματα του πλευριτικού υγρού που το χαρακτήριζαν σαν διίδρωμα.



Προσδιορισμός TNF-α & CEA στο πλευριτικό υγρό και στο αίμα ασθενών με υπεζωκοτική συλλογή

A/a: .....

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ: \_\_\_\_\_

ΔΕΙΓΜΑ: Πλευριτικό υγρό  Αίμα

ΚΛΙΝΙΚΗ: .....

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: .....

ΗΛΙΚΙΑ: .....

ΚΑΠΝΙΣΜΑ (πακέτα/ημέρα X έτη): .....

**ΑΙΤΙΑ ΕΙΣΟΔΟΥ:**

ΥΠΕΖ. ΣΥΛΛΟΓΗ: ΔΕΞΙΑ  ΑΡΙΣΤΕΡΑ

ΜΑΝΤΟΥΧ:

ΔΙΑΓΝΩΣΗ:

ΤΡΟΠΟΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ: Βιοψία υπεζωκότα   
Κυτταρολογική πλ. Υγρού   
Μικροβιολογική πλ. Υγρού

ΓΕΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΣ: Λευκά αιμοσφαίρια (αριθμός): .....

Τύπος λευκών αιμοσφαιρίων: .....

ΤΚΕ.....

**ΑΙΜΑ:**

Σάκχαρο: .....

LDH: .....

Λευκώματα: .....

Ολική ADA (ορού): .....

**ΠΛΕΥΡΙΤΙΚΟ ΥΓΡΟ:**

Σάκχαρο: .....

LDH:.....

Λευκώματα: .....

Ολική ADA πλ. υγρού: .....

**ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ:**

*Εικόνα 4* : Πρωτόκολλο για τη διάγνωση υπεζωκοτικής συλλογής.



⇒ Προσδιορισμός του TNF-alpha και του CEA με την χρήση ανοσολογικών τεχνικών

Η ευρεία εφαρμογή των ανοσολογικών τεχνικών στην κλινική βιοχημεία, κλινική φαρμακολογία, ανοσολογία, μικροβιολογία και ενδοκρινολογία οδήγησε τα τελευταία χρόνια στη ραγδαία ανάπτυξή τους.

Οι **ραδιοαναλύσεις (RIA)** ήταν οι πρώτες που εφαρμόστηκαν. Στην προσπάθεια να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν οι RIA, αναπτύχθηκαν οι **ανοσοενζυμικές τεχνικές (EIA)**. Σε αντίθεση με τους ραδιενεργούς ιχνηθέτες, οι ενζυμικοί είναι πολύ σταθεροί, ακίνδυνοι, προσφέρουν μεγάλη δυνατότητα αυτοματοποίησης και σε συνδυασμό με τα συστήματα αβιδίνης-βιοτίνης ή συζευγμένων NAD, υψηλή ευαισθησία (Πίν.9). Παράλληλα αναπτύχθηκαν τα **συστήματα ανοσοφθορισμού (FIA)** και **χημειοφωταύγειας (CLIA)**, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με τις ανοσοενζυμικές μεθόδους. Τα πλεονεκτήματα των FIA και CLIA είναι η αυξημένη γραμμικότητα σε συνδυασμό με μικρούς χρόνους επώασης και το ευρύ φάσμα εξετάσεων, αν και τα εξειδικευμένα **συστήματα πολωμένου φθορισμού (FPIA)** είναι κατάλληλα μόνο για τη μέτρηση μικρών απτενών και φαρμάκων.

Η πιο πρόσφατη εξέλιξη στις ανοσολογικές μεθόδους είναι η **ηλεκτροχημειοφωταύγεια (ECL)**. Σε αντίθεση με την χημειοφωταύγεια, η εκπομπή φωτός από τον ιχνηθέτη ενεργοποιείται ηλεκτρικά, με την εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού και όχι χημικά. Το πλεονέκτημα της ηλεκτρικής ενεργοποίησης της αντίδρασης είναι ο περιορισμός των προβλημάτων που σχετίζονται με την προσθήκη και την ανάδευση αντιδραστηρίων<sup>31</sup>.

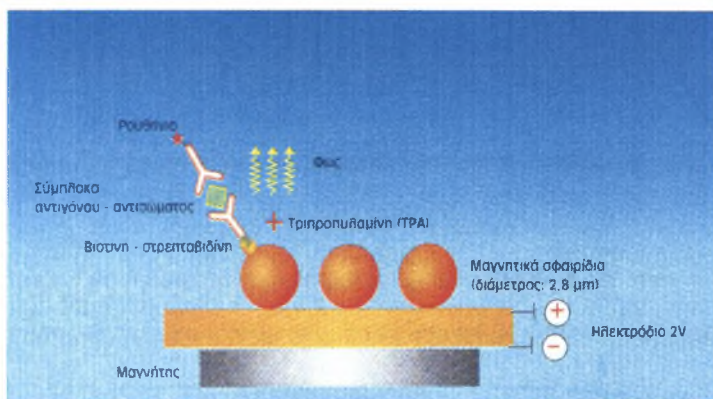
**Πίνακας 9:** Τα βασικά πλεονεκτήματα των ανοσολογικών τεχνικών

|                                     | RIA | EIA | LIA | ECL |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| Χρόνος επώασης 20 λεπτά             |     |     |     | ✓   |
| Μεγάλη γραμμικότητα 10 <sup>4</sup> |     |     | ✓   | ✓   |
| Ευαισθησία 1pmol                    | ✓   |     |     | ✓   |
| Σταθερότητα αντιδραστηρίων          |     | ✓   |     | ✓   |
| Ευρύ φάσμα εξετάσεων                | ✓   | ✓   | ✓   | ✓   |
| Δυνατότητα μελλοντικής ανάπτυξης    |     | ✓   | ✓   | ✓   |



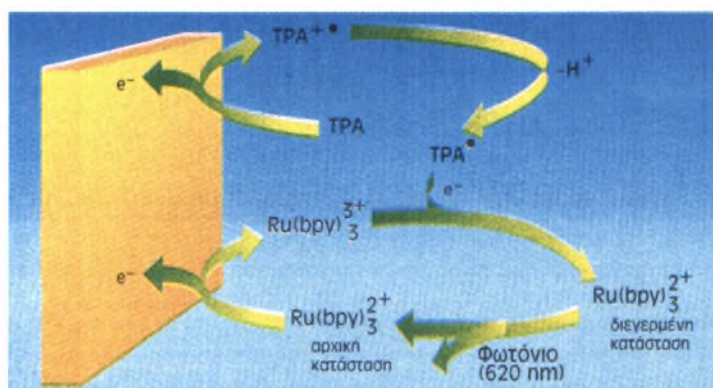
### A. Μέθοδος προσδιορισμού του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA).

Ο προσδιορισμός του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) πραγματοποιείται με την βοήθεια της ανοσοαντίδρασης ηλεκτροχημειοφωταύγειας (ECL). Η μέθοδος αυτή συνδυάζει την αντίδραση αντισώματος-αντιγόνου στην επιφάνεια ενός μαγνητικού σφαιριδίου με την ηλεκτροχημική αντίδραση στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου που οδηγεί στην παραγωγή φωταύγειας (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5:** Η βασική αρχή της ηλεκτροχημειοφωταύγειας (ECL).

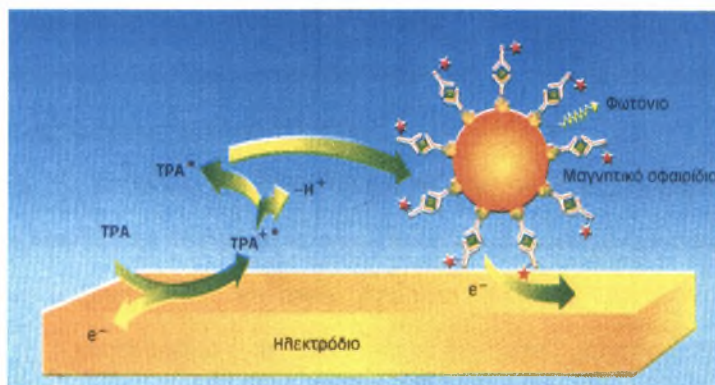
Στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου, με την εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού, η τριπροπυλαμίνη (TPA), η οποία αποτελεί συστατικό του ρυθμιστικού διαλύματος και το ρουθίνιο οξειδώνονται αποβάλλοντας από ένα ηλεκτρόνιο. Η οξείδωση του συμπλέγματος ρουθηνίου πραγματοποιείται πάνω στα μαγνητικά σφαιρίδια που αποτελούν μέρος του ανοσολογικού συμπλέγματος. Η  $TPA^+$  αυτομάτως χάνει ένα πρωτόνιο και η ασταθής ρίζα που προκύπτει προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο στο  $Ru(bpy)_3^{3+}$  (Εικόνα 6).



**Εικόνα 6:** Η αντίδραση ηλεκτροχημειοφωταύγειας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.



Το διεγερμένο ρουθίνιο επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση εκπέμποντας ένα φωτόνιο σε μήκος κύματος 620nm. (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7:** Η αντίδραση ηλεκτροχημειοφωταύγειας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Τελικά, το σήμα της ηλεκτροχημειοφωταύγειας παράγεται στο ηλεκτρόδιο μέσα στον θάλαμο μέτρησης του συστήματος, όπου επιτελούνται οι εξής διεργασίες<sup>32</sup>:

⇒ Τα μαγνητικά σφαιρίδια πάνω στα οποία είναι συνδεδεμένα τα ανοσολογικά συμπλέγματα, με την βοήθεια ενός μαγνήτη, σταθεροποιούνται ομοιόμορφα πάνω στο ηλεκτρόδιο, όπου και συγκρατούνται για σύντομο χρονικό διάστημα. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίου (TPA) απομακρύνει την περίσσεια δείγματος και αντιδραστηρίων.

⇒ Με την εφαρμογή καθορισμένου ηλεκτρικού δυναμικού ενεργοποιείται η αντίδραση της ηλεκτροχημειοφωταύγειας που οδηγεί στην εκπομπή φωτός.

⇒ Απομακρύνεται ο μαγνήτης από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου και απελευθερώνονται τα μαγνητικά σφαιρίδια.

⇒ Ο θάλαμος ξεπλένεται με καθαριστικό διάλυμα και είναι έτοιμος για την επόμενη μέτρηση.



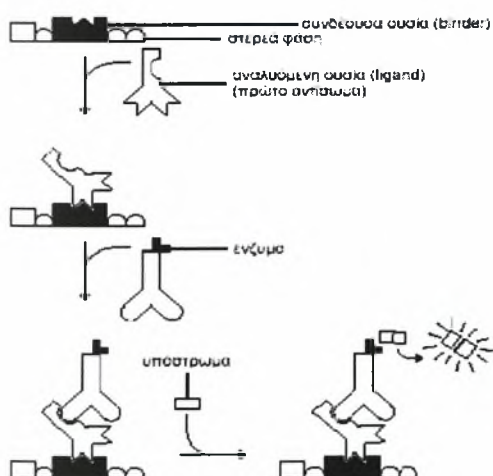


## B. Μέθοδος προσδιορισμού του Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- $\alpha$ ).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του *TNF-alpha* επιτυγχάνεται με την χρήση της ανοσοπροσοροφητικής ανάλυσης στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assays, ELISA*).

Η βασική αρχή της μεθόδου (**Εικόνα 8**) στηρίζεται σε ένα ολιγοκλωνικό σύστημα, στο οποίο μονοκλωνικά αντισώματα στοχεύουν συγκεκριμένα επίτοπα του αντιγόνου. Τα αντιγόνα επωάζονται σε ισότονο διάλυμα αλάτων μέσα στα βοθρία της μικροπλάκας, με αποτέλεσμα να προσδένονται στα παγιδευμένα αντισώματα (**MAbI**). Το ελεύθερο αντιγόνο απομακρύνεται με πλύση. Το πρώτο αντίσωμα (**MAbI**) ανιχνεύεται από ένα δεύτερο αντίσωμα (**MAbII**) σημασμένο με υπεροξειδάση (**HRP**). Ακολουθεί επώαση κατά την οποία δημιουργείται το σύμπλοκο της μορφής: *παγιδευμένο MAbI-αντιγόνο - MAbII-HRP* και στη συνέχεια η μικροπλάκα πλένεται, ώστε να απομακρυνθούν τα μη προσδεμένα σημασμένα αντισώματα<sup>33</sup>.

Το σημασμένο αντίσωμα καθίσταται ορατό με την προσθήκη χρωμογόνου υπό μορφή διαλύματος (**TMB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**), επάνω στο οποίο δρα η υπεροξειδάση για να παραχθεί ένα έγχρωμο τελικό προϊόν. Ακολουθεί επώαση και τερματισμός της αντίδρασης με την προσθήκη H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Το ποσό του υποστρώματος που έχει καταναλωθεί, προσδιορίζεται εκτιμώντας την ποσότητα του έγχρωμου τελικού προϊόντος με σάρωση της οπτικής πυκνότητας του πλακιδίου στα 450nm. Η τιμή της απορρόφησης που καταγράφεται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντιγόνου (**TNF-alpha**) στο δείγμα.



**Εικόνα 8:** Διαγραμματική παράσταση της ανοσοπροσοροφητικής ενζυμικής δοκιμασίας (ELISA)



Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό του *TNF- $\alpha$* , περιλαμβάνει τα βήματα του παρακάτω πίνακα (Πίν.10):

**Πίνακας 10:** Το πρωτόκολλο προσδιορισμού του *TNF- $\alpha$* .

|   | Standards ( $\mu$ l) | Samples ( $\mu$ l) |
|---|----------------------|--------------------|
| <b>Incubation buffer</b>  | <b>50</b>            | <b>50</b>          |
| <b>Standards (0-5)</b>  | <b>200</b>           | <b>-</b>           |
| <b>Controls-samples</b>   | <b>-</b>             | <b>200</b>         |
| Incubate for 2 hours at R.T. with continuous shaking (700 RPM)<br>Aspirate the contents of each well<br>Wash 3 times with 0.4 ml of <b>Wash Solution</b> and aspirate |                      |                    |
| <b>Standard 0</b>   | <b>100</b>           | <b>100</b>         |
| <b>Anti-TNF-<math>\alpha</math>-HRP Conjugate</b>   | <b>50</b>            | <b>50</b>          |
| Incubate for 2 hours at R.T. with continuous shaking (700 RPM)<br>Aspirate the contents of each well<br>Wash 3 times with 0.4 ml of <b>Wash Solution</b> and aspirate |                      |                    |
| <b>Chromogenic Solution</b>   | <b>200</b>           | <b>200</b>         |
| Incubate 30 min. at R.T. with continuous shaking  |                      |                    |
| <b>Stop Solution</b>  | <b>50</b>            | <b>50</b>          |
| Read on a microtiter plate reader and record the absorbance of each well at 450 nm  |                      |                    |



## 7. ΒΑΣΙΚΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

⇒ **Ευαισθησία:** Εκφράζει το ποσοστό των ασθενών που έχουν τιμές έξω από το διάστημα αναφοράς. Μαθηματικά δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Ευαισθησία} = \frac{A\Theta}{A\Theta + \Psi A} \times 100$$

όπου  $A\Theta$  = Αληθώς θετικά και  $\Psi A$  = Ψευδώς αρνητικά. Ο παραπάνω τύπος εκφράζει την ευαισθησία (για μία συγκεκριμένη τιμή αναφοράς), ως το ποσοστό των περιστατικών (ασθενών) που δίνουν θετικό αποτέλεσμα<sup>34</sup>.

⇒ **Ειδικότητα:** Το ποσοστό των ατόμων που δεν έχουν την ασθένεια που μας ενδιαφέρει και εμπίπτουν στο διάστημα.

Η ειδικότητα δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Ειδικότητα} = \frac{A\Lambda}{A\Lambda + \Psi\Theta} \times 100$$

όπου  $A\Lambda$  = Αληθώς αρνητικά και  $\Psi\Theta$  = Ψευδώς θετικά. Ο παραπάνω τύπος εκφράζει την ειδικότητα, ως το ποσοστό των υγιών ατόμων που δίνουν αρνητικό αποτέλεσμα με την τιμή που επιλέχθηκε<sup>34</sup>.

Η ιδανική μέθοδος βιοχημικής ανάλυσης για μια συγκεκριμένη παράμετρο είναι αυτή που έχει ευαισθησία και ειδικότητα ίση με 100%.

⇒ **ROC ανάλυση:** Απεικονίζει τη σχέση ευαισθησίας και ειδικότητας υπό μορφή καμπύλης (*καμπύλη ROC*). Στηρίζεται στην αρχή ότι ο αριθμός των  $\Psi\Theta$  αποτελεσμάτων είναι συνάρτηση της ευαισθησίας. Όσο αυξάνει η ευαισθησία, τόσο αυξάνει και ο αριθμός των  $\Psi\Theta$  αποτελεσμάτων, γραμμικά στην αρχή αλλά από ένα σημείο και μετά ο αριθμός των  $\Psi\Theta$  αυξάνει εκθετικά με δυσανάλογο αποτέλεσμα πάνω στην ειδικότητα που κυριολεκτικά εξαφανίζεται.



Για κάθε μέθοδο υπάρχει ένα όριο ευαισθησίας που όταν ξεπεραστεί, ο αριθμός των ΨΘ αποτελεσμάτων γίνεται ανεπίτρεπτα μεγάλος. Όσο πιο κοντά βρίσκεται η κορυφή της καμπύλης προς το 100% των ΑΘ αποτελεσμάτων, τόσο καλύτερη είναι η μέθοδος μας. Σαν όριο λήψης απόφασης (διακριτική τιμή) παίρνουμε το σημείο εκείνο όπου το άθροισμα των ΑΘ και ΑΑ αποτελεσμάτων έχει τη μεγαλύτερη τιμή. Οι καμπύλες ROC μας επιτρέπουν να παρακολουθούμε τη βελτιστοποίηση των μεθόδων μας όσον αφορά στα χαρακτηριστικά της ευαισθησίας και ειδικότητας<sup>34</sup>.



## 8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα δημογραφικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πλευριτικού υγρού στις διάφορες ομάδες ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής καταγράφονται στους πίνακες που ακολουθούν. Οι τιμές είναι ταξινομημένες κατά νόσημα. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα Prism 4.0 και η ROC ανάλυση με το πρόγραμμα MedCalc.

**Πίνακας 11:** Δημογραφικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πλευριτικού υγρού στις διάφορες ομάδες ασθενών.

|                          | Παραπνευμονική<br>Συλλογή<br>(n=15) | Φυματίωση<br>(n=25)                 | Κακοήθεια<br>(n=57)                 | Διυδρώματα<br>(Συμφορητική<br>Καρδιακή Ανεπάρκεια)<br>(n=27) |
|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| Ηλικία (έτη)             | 50 $\pm$ 22<br>(21,0-86,0)          | 55 $\pm$ 16,51<br>(19,0-84,0)       | 70 $\pm$ 11<br>(27,0-92,0)          | 70 $\pm$ 9<br>(46,0-88,0)                                    |
| Φύλο (Άρρεν/Θήλυ)        | 12/3                                | 17/8                                | 39/18                               | 21/6   |
| Αριθμός κυττάρων ΠΥ      | 10010 $\pm$ 6006<br>(3600 - 22000)  | 2767 $\pm$ 1301<br>(1280 - 7500)    | 1997 $\pm$ 1419<br>(200 - 7300)     | 857,6 $\pm$ 404,6<br>(105 - 1700)                            |
| Λεμφοκύτταρα ΠΥ (%)      | 12,8 $\pm$ 6,7<br>(5 - 28)          | 77,1 $\pm$ 13<br>(50 - 95)          | 60,8 $\pm$ 18<br>(50 - 92)          | 50,4 $\pm$ 21,4<br>(5 - 79)                                  |
| Ουδετερόφιλα ΠΥ (%)      | 73,8 $\pm$ 18,6<br>(44 - 93)        | 11,5 $\pm$ 6,7<br>(0 - 0,25)        | 17,3 $\pm$ 11,9<br>(0 - 41)         | 13,2 $\pm$ 9<br>(0 - 30)                                     |
| Γλυκόζη ΠΥ (mg/dl)       | 49,2 $\pm$ 48,1<br>(3,0 - 132)      | 90,68 $\pm$ 22,05<br>(59,0 - 167,0) | 111,8 $\pm$ 41,78<br>(12,0 - 226,0) | 126,3 $\pm$ 32,51<br>(95,0 - 247,0)                          |
| Ολικά λευκώματα ΠΥ (g/L) | 5 $\pm$ 0,6<br>(3,7 - 6,2)          | 5,20 $\pm$ 0,73<br>(4,19 - 6,85)    | 4,52 $\pm$ 0,95<br>(1,87 - 8,6)     | 2,06 $\pm$ 0,72<br>(1,0 - 4,0)                               |
| Ολικά λευκώματα OP (g/L) | 7,1 $\pm$ 0,7<br>(6,0 - 8,1)        | 7,0 $\pm$ 0,8<br>(5,7 - 8,8)        | 6,4 $\pm$ 1,0<br>(3,46 - 8,1)       | 6,0 $\pm$ 1,1<br>(4,2 - 8,3)                                 |
| LDH ΠΥ (UI/L)            | 2563 $\pm$ 2400<br>(618 - 9873)     | 555,3 $\pm$ 274,4<br>(194,0 - 1423) | 491,5 $\pm$ 643,8<br>(97,0 - 4640)  | 111,9 $\pm$ 33,61<br>(65,0 - 199)                            |
| LDH OP (UI/L)            | 203 $\pm$ 55<br>(126,0 - 312,0)     | 226,1 $\pm$ 68,8<br>(125,0 - 395,0) | 308,7 $\pm$ 173,2<br>(112,0 - 1074) | 218,9 $\pm$ 70,33<br>(143,0 - 454,0)                         |



### ✓ Αποτελέσματα CEA

⇒ Το CEA στο πλευριτικό υγρό των ασθενών με κακοήθεια ήταν σε υψηλότερες τιμές ( $\bar{X}=186.8$  ng/mL) σε σχέση με τις τιμές των ασθενών με φυματίωση ( $\bar{X}=1.5$  ng/mL), με παραπνευμονική συλλογή ( $\bar{X}=1.4$  ng/mL) και με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια ( $\bar{X}=1.1$  ng/mL) (Πίνακας 12, Εικόνα 9). Σύμφωνα με την ROC ανάλυση και όριο την τιμή  $>2.49$  ng/mL, η ευαισθησία είναι 68.4% και η ειδικότητα 92.3% (Πίνακας 13, Εικόνα 10).

⇒ Οι τιμές του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου του ορού στις ίδιες ομάδες ασθενών, βρέθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στους ασθενείς με κακοήθεια ( $\bar{X}=53.31$  ng/mL) σε σχέση με τις τιμές των υπόλοιπων ασθενών (φυματίωση  $\bar{X}=1.8$  ng/mL, παραπνευμονική συλλογή  $\bar{X}=1.9$  ng/mL και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια  $\bar{X}=2.2$  ng/mL - Πίνακας 12, Εικόνα 11). Με όριο την τιμή  $>3.1$  ng/mL, η ευαισθησία είναι 61.4% και η ειδικότητα 87.7% (Πίνακας 13, Εικόνα 12).

⇒ Η τιμή του πηλίκου του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου του πλευριτικού υγρού προς τη τιμή του ορού στις τέσσερις ομάδες που μελετήθηκαν είναι: φυματίωση  $\bar{X}=0.82$  ng/mL, κακοήθεια  $\bar{X}=7.96$  ng/mL, παραπνευμονική συλλογή  $\bar{X}=0.78$  ng/mL και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια  $\bar{X}=0.6$  ng/mL (Πίνακας 12, Εικόνα 13). Σύμφωνα με την ROC ανάλυση και όριο την τιμή  $>0.9$  ng/mL, η ευαισθησία είναι 68.4% και η ειδικότητα 81.5% (Πίνακας 13, Εικόνα 14).

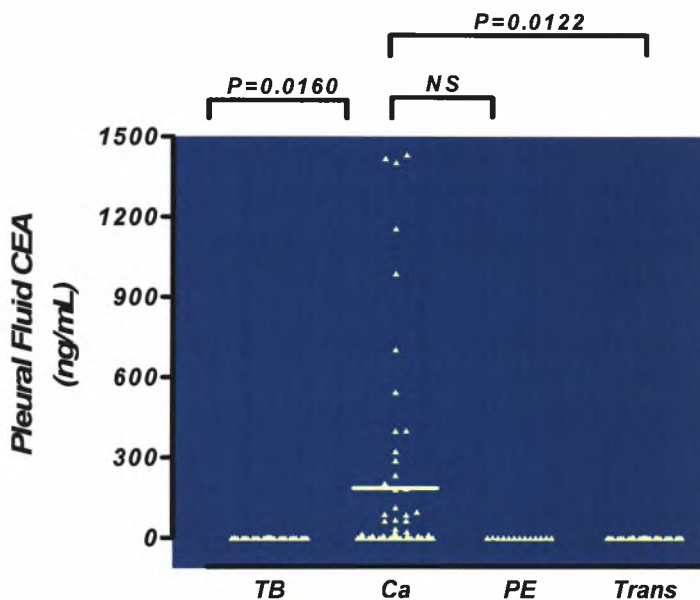
**Πίνακας 12:** Μέσες τιμές και σταθερές αποκλίσεις.

|           | TBC                          | Κακοήθεια                       | Παρ/κή                       | Διίδρωμα (ΣΚΑ)               |
|-----------|------------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| CEA ΠΥ    | 1.46 ± 1.15<br>(0.31 – 5.01) | 186.8 ± 375.2<br>(0.48 - 1433)  | 1.41 ± 0.72<br>(0.59 – 3.19) | 1.05 ± 0.69<br>(0.13 – 2.6)  |
| CEA ΟΡ    | 1.82 ± 0.98<br>(0.75 – 4.79) | 53.31 ± 133.7<br>(0.65 – 651.8) | 1.89 ± 0.72<br>(0.87 – 3.4)  | 2.20 ± 1.56<br>(0.56 – 6.16) |
| CEA ΠΥ/ΟΡ | 0.82 ± 0.46<br>(0.18 – 2.28) | 7.95 ± 22.65<br>(0.32 – 143.0)  | 0.77 ± 0.30<br>(0.35 - 1.42) | 0.59 ± 0.51<br>(0.15 – 2.47) |



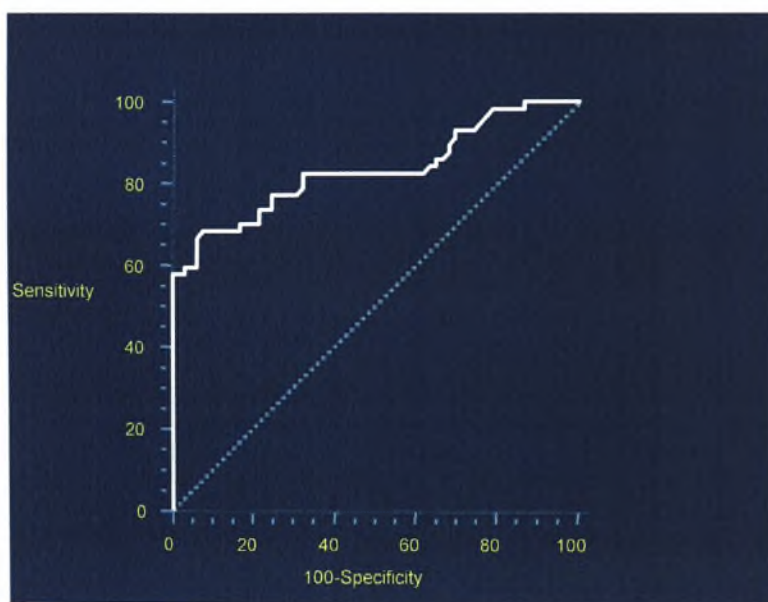
**Πίνακας 13:** Ευαισθησία και ειδικότητα σύμφωνα με τη *ROC analysis*.

|           | Οριακή Τιμή | Ευαισθησία% | Ειδικότητα% |
|-----------|-------------|-------------|-------------|
| CEA ΠΥ    | 2.49        | 68.4        | 92.3        |
| CEA ΟΡ    | 3.1         | 61.4        | 87.7        |
| CEA ΠΥ/ΟΡ | 0.9         | 68.4        | 81.5        |

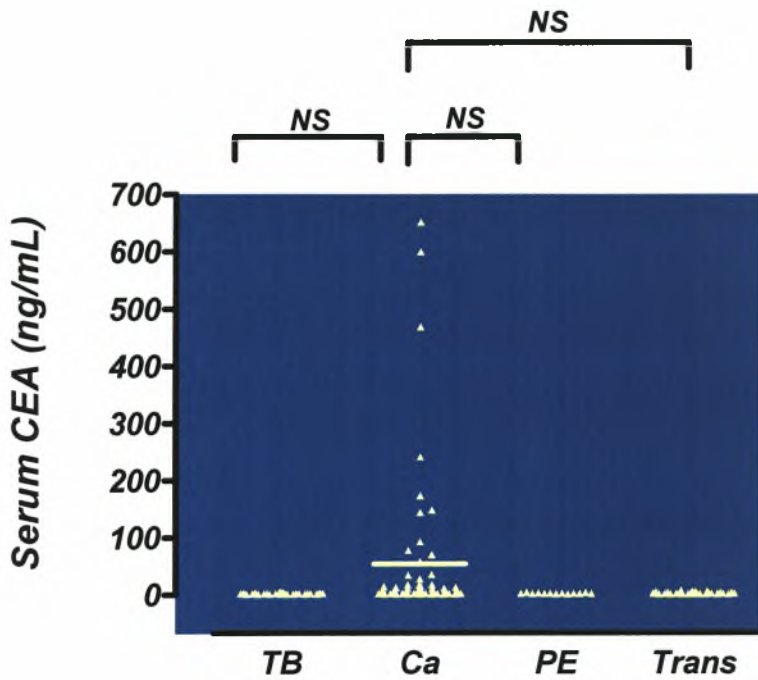


**Εικόνα 9:** Τιμές CEA πλευριτικού υγρού ταξινομημένες κατά νόσημα.

TB = Φυματίωση, Ca = Κακοήθεια, PE = Παραπνευμονική συλλογή, TRANS = Διίδρωμα (Συμφορητική Καρδιακή Ανεπάρκεια).

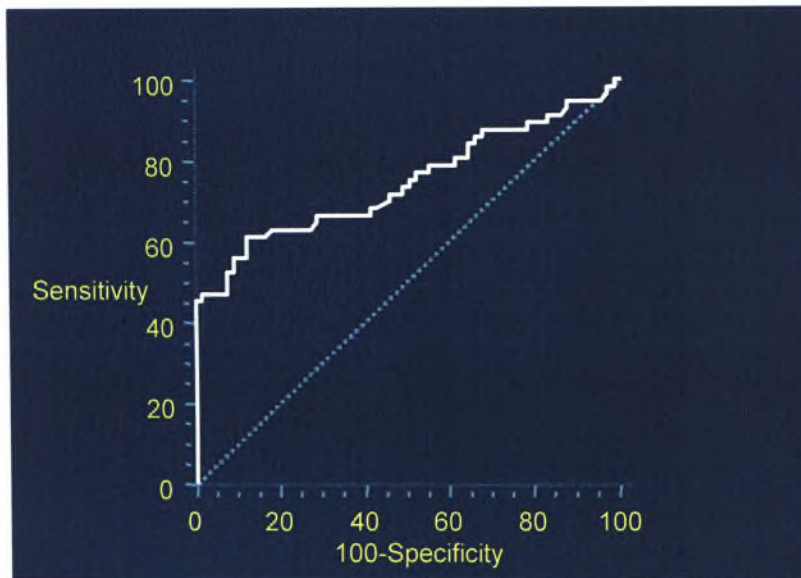


**Εικόνα 10:** CEA ROC ανάλυση MAL με TB, PE και TRANS στο πλευριτικό υγρό.



Εικόνα 11: Τιμές CEA ορού ταξινομημένες κατά νόσημα.

TB = Φυματίωση, Ca = Κακοήθεια, PE = Παραπνευμονική συλλογή, TRANS = Διύδρωμα (Συμφορητική Καρδιακή Ανεπάρκεια).

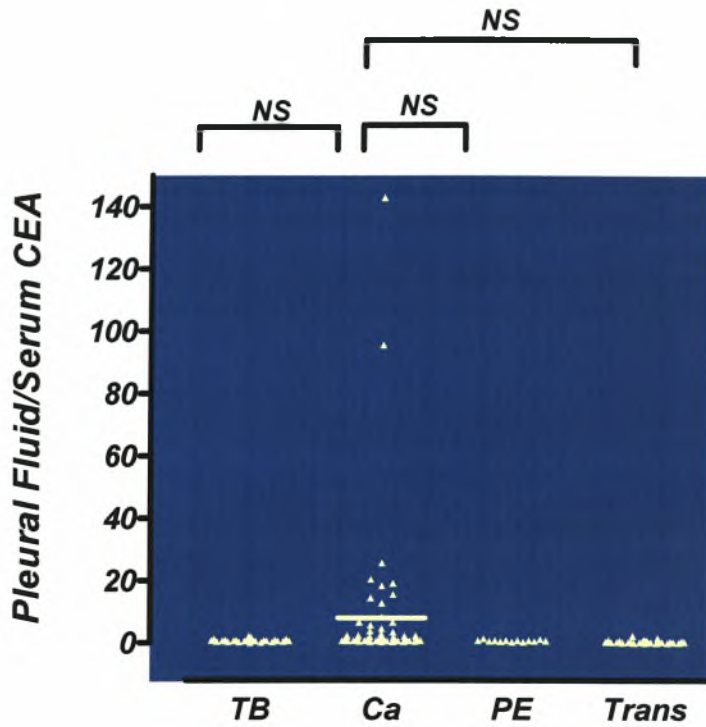


Εικόνα 12: CEA ROC ανάλυση MAL με TB, PE και TRANS στον ορό.



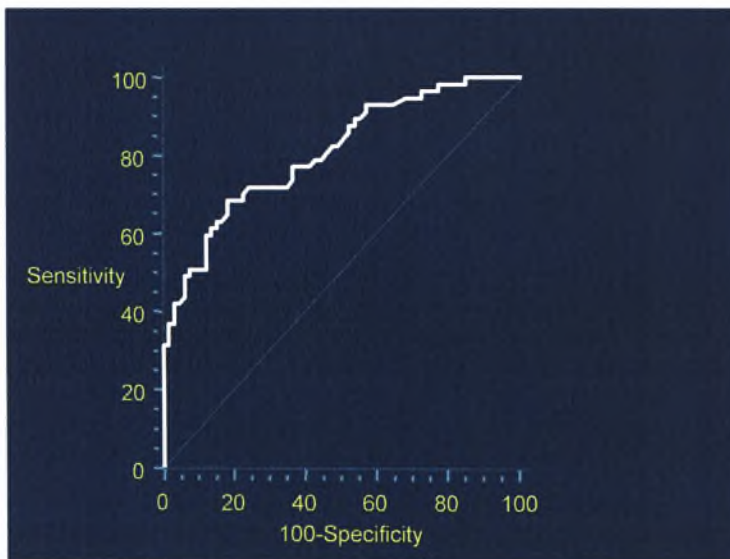


Προσδιορισμός TNF- $\alpha$  & CEA στο πλευριτικό υγρό και στο αίμα ασθενών με υπεζωκοτική συλλογή



Εικόνα 13: Τιμές CEA Π.Υ./ΟΡ ταξινομημένες κατά νόσημα.

TB = Φυματίωση, Ca = Κακοήθεια, PE = Παραπνευμονική συλλογή, TRANS = Διίδρωμα (Συμφορητική Καρδιακή Ανεπάρκεια).

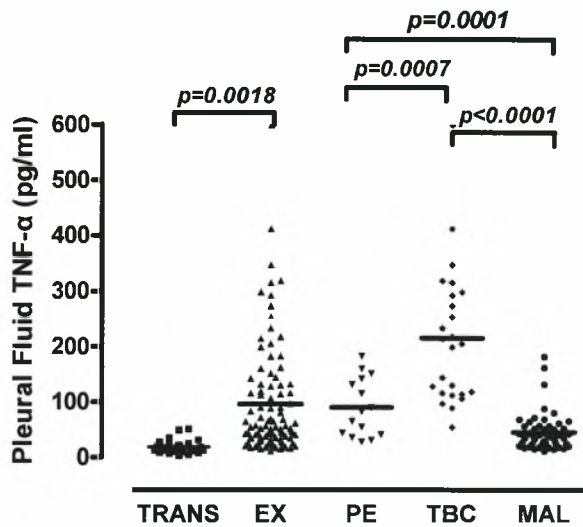


Εικόνα 14: CEA ROC ανάλυση MAL με TB, PE και TRANS στον λόγο ΠΥ/ΟΡ .



✓ Αποτελέσματα TNF-alpha

⇒ Τα επίπεδα του TNF-alpha στο πλευριτικό υγρό των ασθενών με φυματίωση ήταν σε υψηλότερες τιμές ( $\bar{X}$ =215.3 pg/mL) σε σχέση με τις τιμές των ασθενών με κακοήθεια ( $\bar{X}$ =45.38 pg/mL) και με παραπνευμονική συλλογή ( $\bar{X}$ =90.25 pg/mL). Ομοίως, οι ασθενείς με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές ( $\bar{X}$ =18.78 pg/mL) σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες ασθενειών (Πίνακας 14, Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Τιμές TNF-alpha πλευριτικού υγρού ταξινομημένες κατά νόσημα.

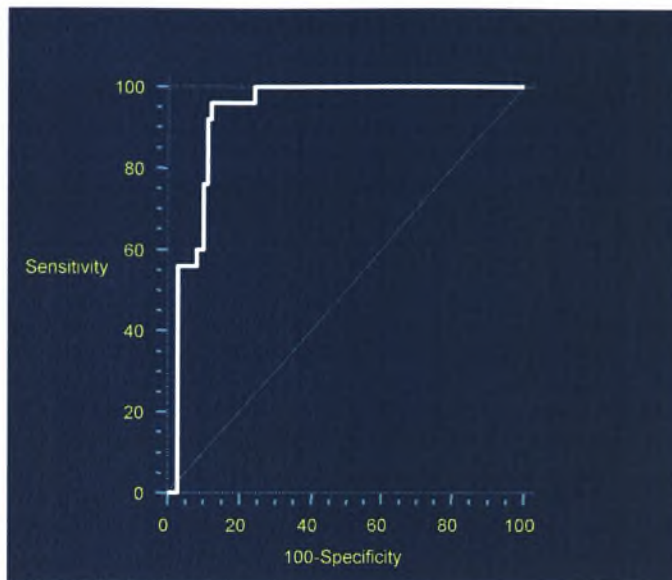
TBC = Φυματίωση, MAL = Κακοήθεια, PE = Παραπνευμονική συλλογή, TRANS = Διύδρωμα (Συμφορητική Καρδιακή Ανεπάρκεια), EX = Εξιδρώματα.

Πίνακας 14: Μέσες τιμές και σταθερές αποκλίσεις.

|                      | TRANS                        | EXUD                         | PE                           | TBC                          | MAL                          |
|----------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| TNF-α ΠΥ<br>pg/ml    | 18.78 ± 11.78<br>(3.5-51)    | 96.11 ± 100.6<br>(11.2-599)  | 90.25 ± 52.86<br>(27.7-183)  | 215.3 ± 124.2<br>(53.9-599)  | 45.38 ± 32.68<br>(11.2-182)  |
| TNF-α OP<br>pg/ml    | 20.74 ± 14.21<br>(2.17-73.2) | 28.74 ± 15.48<br>(3.26-76.6) | 28.37 ± 15.25<br>(11.8-63.5) | 37.33 ± 19.20<br>(23.6-76.6) | 25.07 ± 12.14<br>(3.26-57.4) |
| TNF-α ΠΥ/OP<br>pg/ml | 1.04 ± 0.57<br>(0.4-2.63)    | 3.41 ± 3.12<br>(0.46-14.83)  | 3.63 ± 3.05<br>(1.28-13.56)  | 6.58 ± 3.84<br>(1.46-14.83)  | 1.96 ± 1.19<br>(0.46-6.84)   |

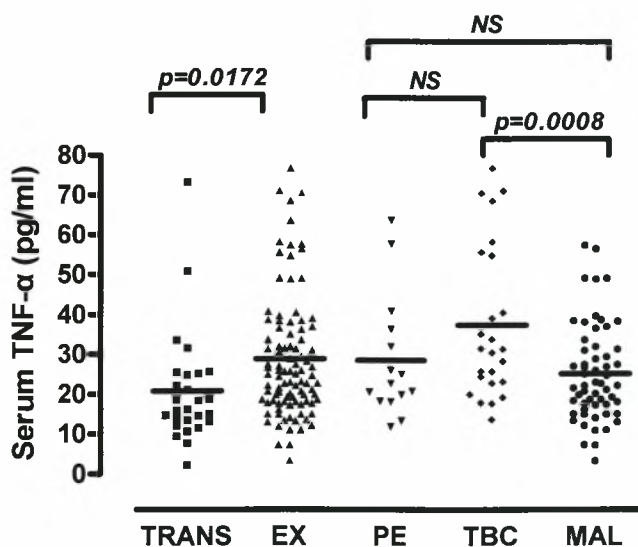


Σύμφωνα με την ROC ανάλυση και όριο την τιμή  $>88.1$  pg/mL, η ευαισθησία είναι 96% και η ειδικότητα 87.9% (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: TNF- $\alpha$  ROC ανάλυση TBC με MAL, PE και TRANS στο πλευριτικό υγρό.

⇒ Οι τιμές του TNF- $\alpha$  του ορού στις ίδιες ομάδες, δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές (φυματίωση  $\bar{X}=37.33$ pg/mL, κακοήθεια  $\bar{X}=25.07$ pg/mL, παραπνευμονική συλλογή  $\bar{X}=28.37$ pg/mL και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια  $\bar{X}=20.74$ pg/mL - Πίνακας 14, Εικόνα 17).



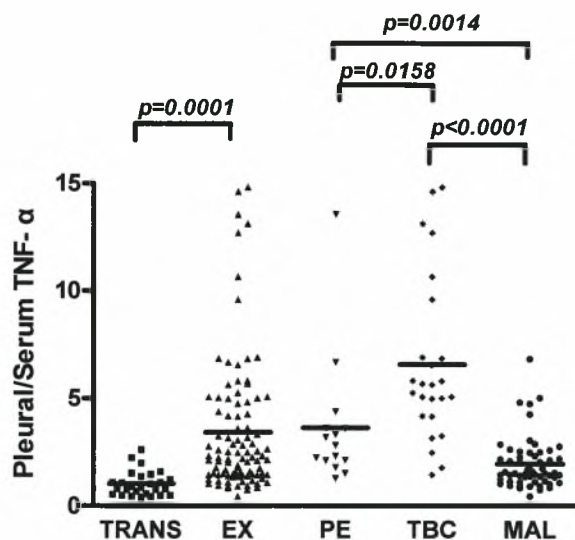
Εικόνα 17: Τιμές TNF- $\alpha$  ορού ταξινομημένες κατά νόσημα.

TBC = Φυματίωση, MAL = Κακοήθεια, PE = Παραπνευμονική συλλογή, TRANS = Διύδρωμα (Συμφορητική Καρδιακή Ανεπάρκεια), EX = Εξιδρώματα.



Προσδιορισμός TNF- $\alpha$  & CEA στο πλευριτικό υγρό και στο αίμα ασθενών με υπεζωκοτική συλλογή

⇒ Η τιμή του πηλίκου του TNF- $\alpha$  του πλευριτικού υγρού προς τη τιμή του ορού βρέθηκε υψηλότερη στους ασθενείς με φυματίωση ( $\bar{X}$  = 6.58pg/mL) και χαμηλότερη στους ασθενείς με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια ( $\bar{X}$  = 1.04pg/mL) σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες που μελετήθηκαν: κακοήθεια  $\bar{X}$  = 1.96pg/mL και παραπνευμονική συλλογή  $\bar{X}$  = 3.63pg/mL (Πίνακας 14, Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Τιμές TNF- $\alpha$  για τον λόγο ΠΥ/ΟΡ, ταξινομημένες κατά νόσημα.

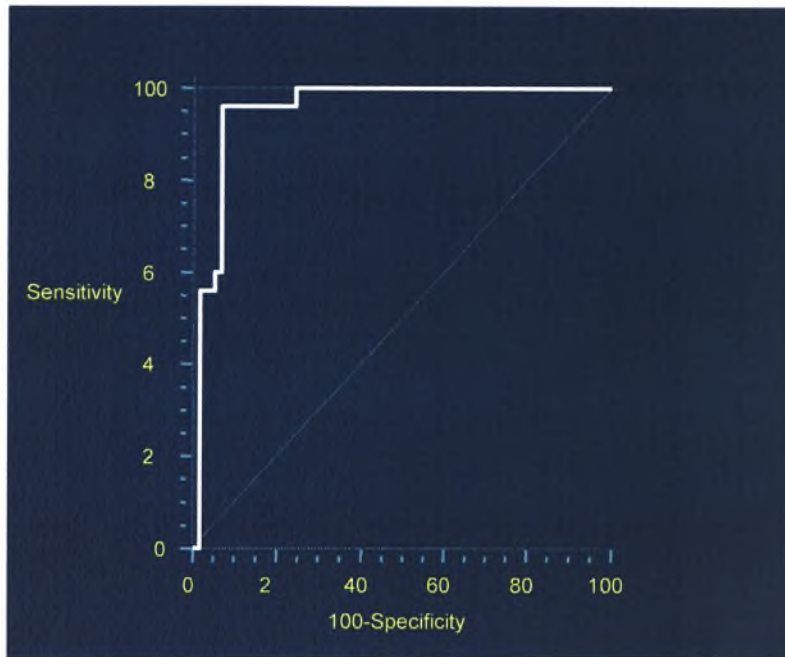
TBC = Φυματίωση, MAL = Κακοήθεια, PE = Παραπνευμονική συλλογή, TRANS = Δίδρομα (Συμφορητική Καρδιακή Ανεπάρκεια), EX = Εξιδρώματα.

Πίνακας 14: Μέσες τιμές και σταθερές αποκλίσεις.

|                              | TRANS                            | EXUD                             | PE                               | TBC                              | MAL                              |
|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| TNF- $\alpha$ ΠΥ<br>pg/ml    | 18.78 $\pm$ 11.78<br>(3.5-51)    | 96.11 $\pm$ 100.6<br>(11.2-599)  | 90.25 $\pm$ 52.86<br>(27.7-183)  | 215.3 $\pm$ 124.2<br>(53.9-599)  | 45.38 $\pm$ 32.68<br>(11.2-182)  |
| TNF- $\alpha$ ΟΡ<br>pg/ml    | 20.74 $\pm$ 14.21<br>(2.17-73.2) | 28.74 $\pm$ 15.48<br>(3.26-76.6) | 28.37 $\pm$ 15.25<br>(11.8-63.5) | 37.33 $\pm$ 19.20<br>(23.6-76.6) | 25.07 $\pm$ 12.14<br>(3.26-57.4) |
| TNF- $\alpha$ ΠΥ/ΟΡ<br>pg/ml | 1.04 $\pm$ 0.57<br>(0.4-2.63)    | 3.41 $\pm$ 3.12<br>(0.46-14.83)  | 3.63 $\pm$ 3.05<br>(1.28-13.56)  | 6.58 $\pm$ 3.84<br>(1.46-14.83)  | 1.96 $\pm$ 1.19<br>(0.46-6.84)   |



Σύμφωνα με την ROC ανάλυση και όριο την τιμή  $>88.1$  pg/mL, ο TNF- $\alpha$  του πλευριτικού υγρού παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία (96%) και ειδικότητα (93%) στη διάκριση μεταξύ των λεμφοκυτταρικών υπεζωκοτικών συλλογών (Εικόνα 19).



**Εικόνα 19:** TNF- $\alpha$  ROC ανάλυση στο πλευριτικό υγρό μεταξύ λεμφοκυτταρικών υπεζωκοτικών συλλογών (TBC με MAL).



## 9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολλές και ποικίλες είναι οι αιτίες των υπεζωκοτικών συλλογών. Η πρόσφατη βελτίωση μεθόδων στην ανακάλυψη και εντόπιση νόσων του υπεζωκότα, όπως επίσης και η καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού συλλογής υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα έδωσαν την δυνατότητα στους κλινικούς ιατρούς να καθορίζουν σε ποσοστό μέχρι 85% την αιτιολογική διάγνωση της υπεζωκοτικής συλλογής<sup>3</sup>.

Η διάγνωση των κακοηθών υπεζωκοτικών συλλογών αποτελεί σημαντικό ιατρικό πρόβλημα και η ύπαρξη των καρκινικών δεικτών μπορεί θεωρητικά να συμβάλλει στη διάγνωση του καρκίνου<sup>35,36</sup>.

Στη παρούσα εργασία, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του CEA στο πλευριτικό υγρό και τον ορό ασθενών με υπεζωκοτική συλλογή και βρέθηκε ότι αυτά ήταν υψηλότερα στους ασθενείς με κακοήθεια σε σχέση με τις υπόλοιπες κατηγορίες ασθενών. Με όριο τα 2.49 ng/mL η ευαισθησία του CEA στο πλευριτικό υγρό φθάνει το 68.4% και η ειδικότητά του το 92.3%. Λόγω της χαμηλής ευαισθησίας, το CEA παρουσιάζει ενδεικτική και όχι διαγνωστική αξία στην διάκριση των κακοηθών υπεζωκοτικών συλλογών. Πρόσφατες μελέτες<sup>37,38,39</sup> φαίνεται ότι συμφωνούν με τα παραπάνω αποτελέσματα.

Υψηλά επίπεδα CEA μπορεί να εμφανιστούν σε μικρό ποσοστό μη-κακοηθών υπεζωκοτικών συλλογών. Οι υπεζωκοτικές συλλογές που οφείλονται σε λοίμωξη αποτελούν ίσως την σημαντικότερη διαγνωστική ομάδα<sup>38</sup>. Ο ακριβής μηχανισμός που προκαλεί αυξημένα επίπεδα του CEA στο πλευριτικό υγρό ασθενών με υπεζωκοτική συλλογή οφειλόμενη σε λοίμωξη παραμένει άγνωστος. Ενδεχομένως, τα ψευδώς αυξημένα επίπεδά του στις μη-κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές να περιλαμβάνουν τον ρόλο αντιγόνων ικανών να προκαλέσουν μη ειδικές διασταυρούμενες αντιδράσεις, ή αλλοιώσεις των πρωτεϊνικών δεικτών του υγρού από βακτηριακά ένζυμα. Ωστόσο, οι υποθέσεις αυτές αδυνατούν να αιτιολογήσουν τα αυξημένα επίπεδα CEA στη παραπνευμονική συλλογή με καλλιέργεια αρνητική για βακτήρια.



Οι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στη συσσώρευση του υγρού στις εξιδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές είναι ελάχιστα μελετημένοι<sup>40</sup>. Η δράση φλεγμονωδών κυττάρων και η παραγωγή κυτταροκινών, όπως ο TNF- $\alpha$ , τα οποία οδηγούν σε αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, έχουν μελετηθεί στο πλευριτικό υγρό ασθενών με κακοήθεια, φυματίωση και εμπύημα<sup>41,42</sup>.

Στη παρούσα εργασία προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του TNF- $\alpha$  στο πλευριτικό υγρό και τον ορό, 97 εξιδρωματικών και 27 διδρωματικών υπεζωκοτικών συλλογών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η συγκέντρωσή του είναι υψηλότερη στο πλευριτικό υγρό ασθενών με εξιδρωματική υπεζωκοτική συλλογή. Τα αυξημένα επίπεδα του TNF- $\alpha$  στο πλευριτικό υγρό σε σχέση με τον ορό, πιθανότατα οφείλονται σε τοπική παραγωγή από φλεγμονώδη κύτταρα, τα οποία έχουν συσσωρευτεί στην υπεζωκοτική κοιλότητα<sup>43,44</sup>.

Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες<sup>45-50</sup>, τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι τα επίπεδα του TNF- $\alpha$  είναι σημαντικά αυξημένα στη φυματιώδη πλευρίτιδα σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες ασθενών. Η σημαντική αύξηση των επιπέδων του σε αυτή την κατηγορία ασθενών πιθανότατα οφείλεται στο ότι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, ιδιαίτερα ο TNF- $\alpha$ , παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ινωδολυτικής δραστηριότητας στην υπεζωκοτική κοιλότητα<sup>30</sup>. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματά μας, οι *Soderblom et al.*<sup>47</sup> και *Xirouchaki et al.*<sup>51</sup>, ισχυρίζονται ότι ο TNF- $\alpha$  δεν μπορεί να διαχωρίσει την φυματιώδη πλευρίτιδα από την κακοήθεια ή την παραπνευμονική συλλογή.

Αυξημένα επίπεδα του TNF- $\alpha$  παρατηρήθηκαν στο πλευριτικό υγρό ασθενών με παραπνευμονική συλλογή. Ο TNF- $\alpha$  μαζί με άλλες κυτταροκίνες επάγει μία σειρά βιολογικών αντιδράσεων, οι οποίες συμβάλλουν στην ενεργοποίηση της απάντησης του ξενιστή στη λοίμωξη και έτσι μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό παθοφυσιολογικό ρόλο στην πρόκληση παραπνευμονικής συλλογής<sup>52</sup>. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν οι *Odeh et al.*<sup>53</sup>, οι οποίοι έδειξαν ότι τα επίπεδα των κυτταροκινών στο πλευριτικό υγρό είναι σημαντικά υψηλότερα στην επιπλεγμένη απ' ό,τι στη μη επιπλεγμένη παραπνευμονική συλλογή, παρουσιάζοντας τον ρόλο του TNF- $\alpha$  στη διάκριση αυτών των δύο ομάδων ασθενών.



## 10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας προκύπτει ότι:

1. Η μέση τιμή του **καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου** στο πλευριτικό υγρό είναι σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα ασθενών με κακοήθεια, σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες στις οποίες προσδιορίστηκε το CEA. Ωστόσο, η αξία του στην διάκριση των κακοηθών υπεζωκοτικών συλλογών είναι μόνο ενδεικτική και όχι διαγνωστική, λόγω της χαμηλής ευαισθησίας που παρουσιάζει.

2. Ο **TNF-alpha** του πλευριτικού υγρού μπορεί να διακρίνει τα εξιδρώματα από τα διδρώματα.

3. Οι αυξημένες τιμές **TNF-alpha** στο πλευριτικό υγρό μπορούν να αποτελέσουν σημαντικό εργαλείο στη διαφοροδιάγνωση της TB πλευρίτιδας.

4. Ο **TNF-alpha** του πλευριτικού υγρού με όριο τα 88.1 pg/mL μπορεί να διακρίνει τις λεμφοκυτταρικές υπεζωκοτικές συλλογές (φυματίωση, κακοήθεια) με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα.





## 11. ABSTRACT

The aim of this study is to define the diagnostic value of carcinoembryonic antigen (*CEA*) and tumor necrosis factor-alpha (*TNF- $\alpha$* ) in the differential diagnosis of pleural effusions.

Using a commercially-available ELISA kit and electrochemiluminescence assay, concentrations of TNF and CEA measured in the serum and pleural fluid of patients with malignant effusions (n=57), tuberculosis (n=25), parapneumonic effusions (n=15) and transudative (n=27) due to congestive heart failure.

In the group with malignancy, pleural fluid CEA was found significantly higher than in the other groups ( $p < 0.05$ ). At an optimal cut-off point of 2.49 ng/mL for pleural fluid CEA, determined by ROC analysis, sensitivity was 68.4% and specificity 92.3%. Pleural fluid TNF was significantly higher in exudates than in transudates ( $p = 0.0018$ ). In exudates, pleural fluid TNF was higher in tuberculous pleurisy than in other groups ( $p = 0.0001$ ). According to ROC analysis for discrimination between tuberculous pleurisy and other groups, with an optimal cut-off 88.1 pg/mL for pleural fluid TNF, sensitivity was 96% and specificity 87.9%, while for discrimination of lymphocytic pleural effusions, was 96% and 93%, respectively. Serum TNF did not differ between the four groups ( $p > 0.05$ ).

In conclusion, it appears that CEA in pleural fluid is not useful in the differential diagnosis of malignant pleural effusions. High levels of pleural fluid TNF help to a significant extent the differential diagnosis of the tuberculous from other causes of pleural effusions as well as the distinction the transudation from exudates. Also it can discriminate lymphocytic pleural effusions with high sensitivity and specificity.



## **12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Pistolesi M, Miniati M, Giuntini C. Pleural liquid and solute exchange *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989, 140:825.
2. Παθολογία CECIL. Τόμος Α, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας 1991 pp.521-526.
3. Strankinga WFM, Nauta JJP, Straud JP, Stram J. Adenosine deaminase activity in tuberculous pleural effusions: A diagnostic test. *Tubercle* 1987, 68: 137-140.
4. Μ. Παπαδημητρίου, “Εσωτερική Παθολογία”, Τόμος Α, Εκδόσεις Επιστημονικών Βιβλίων και Περιοδικών Θεσσαλονίκη 1998 pp 521-522, 524-526.
5. V.B. Antony, “Τα πολλά πρόσωπα του υπεζωκότα”, Ανοσολογικοί Μηχανισμοί Παθήσεων του Υπεζωκότα, InfoRespiratory medicine.
6. J.A. Paré, R.G. Fraser, “Synopsis of disease of the chest”, FIRST EDITION, W.B. Saunders Company 1983.
7. L. Zocchi. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J* 2002;20:1545-1558.
8. Light RW, MacGregor MI, Luchinger PC et al. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Int Med* 1972;77:507-521.
9. Heffner J.E., Brown L.K. and Barbieri C.A. Diagnostic Value of Tests That Discriminate Between Exudative and Transudative Pleural Effusions. *Chest* 1997;111(4):970-980.
10. Burgess L.J., Maritz F.J et. al. Comparative Analysis of Biochemical Parameters Used to Distinguish Between Pleural Transudates and Exudates. *Chest* 1995;107(6):1604-1609.
11. Paramothayan N.S., Barron J. New Criteria for the differentiation between transudates and exudates. *J Clin Pathol* 2002;55:69-71.
12. R. Albert, S. Spiro, J. Jett, “Comprehensive Respiratory Medicine”,
13. Kochi A. The global tuberculosis and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1991;72:1-6.
14. G.T. Kinasewitz. Transudative effusions. *Eur Respir J* 1997;10 : 714-718.
15. Kinasewitz G.T. Transudative effusions. *Eur Respir J* 1997;10:714-718.
16. Eid A., Keddissi J.I. et al. Exudative Effusions in Congestive Heart Failure. *Chest* 2002;122(5):1518-1523.
17. Stephen J. Chapman, Robert J.O. Davies. *The management of pleural space infections. Respiriology* (2004) 9, 4-11.



18. Light et al. "Pulmonary disease diagnosis and therapy: A practical approach" *Am J Med* 69: 507-511, 1980.
19. Decker JL, Malone DG et al. NIH conference. Rheumatoid arthritis: evolving concepts of pathogenesis and treatment. *Ann Intern Med* 1984;101:810-823.
20. Gold Phil., Goldenberg N.A. The Carcinoembryonic Antigen (CEA): Past, Present, and Future. *MJM* 1997;3:46-66.
21. Rosenthal KL., Palmer JL. et al. Antibody-induced redistribution of CEA on the cell surface: utilization in separation of CEA and isoantigen A. *Journal of Immunology* 1975;115(4):1049-1053.
22. Pignatelli M., Durbin H. and Bodmer WF. Carcinoembryonic antigen functions as an accessory adhesion molecule mediating colon epithelial cell-collagen interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 1990;87(4):1541-1545.
23. Thompson J., Mauch EM. et al. Analysis of the size of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family: isolation and sequencing of N-terminal domain exons. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1989;158(3):996-1004.
24. Thompson J., Koumari R., Wagner K. et al. The human pregnancy-specific glycoprotein genes are tightly linked on the long arm of chromosome 19 and are coordinately expressed. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1990;167(2):848-859.
25. Benchimol S., Fuks A., Jothy S. et al. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 1989;57(2):327-334.
26. Waalkes TP., Abeloff MD., Woo KB. et al. Carcinoembryonic antigen for monitoring patients with small cell carcinoma of the lung during treatment. *Cancer Research* 1980;40(12):4420-4427.
27. Goslin RH., O'Brien MJ., Skarin AT. et al. Immunocytochemical staining for CEA in small cell carcinoma of lung predicts clinical usefulness of the plasma assay. *Cancer* 1983;52(2):301-306.
28. Sculier JP., Body JJ., Jacobowitz D. et al. Value of CEA determination in biological fluids and tissues. *European Journal of Cancer & Clinical Oncology* 1987;23(8):1091-1093.
29. Oppenheim JJ., Rossio JL. and Gearing JH. "Clinical Applications of Cytokines: Role in pathogenesis, diagnosis and therapy".
30. Prabha C., Jalapathy KV. et al. Role of TNF- $\alpha$  in host immune response in tuberculous pleuritis. *Current Science* 2003;85(5):639-642.
31. Arora A., Andrew J. de Mello and Andreas Manz. Sub-microliter Electrochemiluminescence Detector-A Model for Small Volume Analysis Systems. *Analytical Communications* 1997;34:393-395.



32. Haiyan Wang, Guobao Xu and Shaojun Dong. Electrochemiluminescence of Tris (2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) Ion-Exchanged in Polyelectrolyte-Silica Composite Thin Films. *Electroanalysis* 2002;14(12):853-857.
33. Whiteside TL. Assays for human cytokines and their interpretation. *Clin Immunol Newslett* 1998;18:69-77.
34. Γ.ΓΕΩΡΓΑΤΣΟΥ, Π.ΛΑΡΖΟΓΛΟΥ. ΑΡΧΕΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ.. Εκδόσεις Γιαχούδη – Γιακούλη 1999.
35. Porcel JM., Vives M., Esquerda A. et al. Use of Panel of Tumor Markers (Carcinoembryonic antigen, Cancer Antigen 125, Carbohydrate Antigen 15-3 and Cytokeratin 19 Fragments) in Pleural Fluid for the Differential Diagnosis of Benign and Malignant Effusions. *Chest* 2004;126(6):1757-1763.
36. Maskell NA., Butland RJA. BTS guidelines for the investigation of the unilateral pleural effusion in adults. *Thorax* 2003;58(suppl II):ii8-ii17.
37. Jeong-Seon RYU, Hun-Jae Lee, Jae-Hwa CHO et al. The implication of elevated carcinoembryonic antigen level in pleural fluid of patients with non-malignant pleural effusion. *Respirology* 2003;8:487-491.
38. Eduardo Garcia-Pachon et al. Elevated Level of Carcinoembryonic Antigen in Nonmalignant Pleural Effusions. *Chest* 1997;111(3):643-647.
39. Pratheep Riantawan et al. Limited Additive Value of Pleural Fluid Carcinoembryonic Antigen Level in Malignant Pleural Effusion. *Respiration* 2000;67:24-29.
40. Enas A. Hamed, Amira M. EL-Noweih, Ashraf Z. Mohamed and Azza Mahmoud. Vasoactive mediators (VEGF and TNF-α) in patients with malignant and tuberculous pleural effusions. *Respirology* 2004;9:81-86.
41. Yano S., Shinohara H., Kuniyasu H. Formation of pleural effusion by human lung adenocarcinoma directly correlates with expression of VEGF/VPF. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 1999;40:227a.
42. Worrall NK, Chang K., Le Jeune WS et al. TNF-α causes reversible in vivo systemic vascular barrier dysfunction via NO-dependent and independent mechanisms. *Am. J. Physiol.* 1997;273:H2565-H2574.
43. Antony VB, Godbey SW, Kunkel SL. et al. Recruitment of inflammatory cells to the pleural space: chemotactic cytokines, IL-8, and monocyte chemotactic peptide-1 in human pleural fluids. *J Immunol* 1993;151:7216-7223.
44. Nakano T., Chahinian AP., Shinjo M. et al. Interleukin 6 and its relationship to clinical parameters in patients with malignant pleural mesothelioma. *Br J Cancer* 1998;77:907-912.



45. Chung-Ching Hua, Liang-Che Chang, Yi-Chu Chen and Shi-Chuan Chang. Proinflammatory Cytokines and Fibrinolytic Enzymes in Tuberculous and Malignant Pleural Effusions. *Chest* 1999;116(5).
46. Gursel G., Gokcora N., Elbeg S. et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-a) in pleural fluids. *Tuber Lung Dis* 1995;76:370-371.
47. Soderblom T., Nyberg P., Teppo AM. et al. Pleural fluid interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in tuberculous and rheumatoid pleurisy. *Eur Respir J* 1996;9:1652-1655.
48. Orphanidou D., Gaga M., Rasidakis A. et al. Tumor necrosis factor, interleukin-1 and adenosine deaminase in tuberculous pleural effusion. *Respir Med* 1996;90:95-98.
49. Barnes PF, Fong SJ, Brennan PJ. et al. Local production of tumor necrosis factor and IFN- $\gamma$  in tuberculous pleuritis. *J Immunol* 1990;145:149-154.
50. Kim YC, Park KO, Bom HS, et al. Combining ADA, protein and IFN- $\gamma$  best allows discrimination between tuberculous and malignant pleural effusion. *Korean J Intern Med* 1997;12:225-231.
51. Xirouckaki N., Tzanakis N., Bouros D. et al. Diagnostic Value of Interleukin-1 $\alpha$ , Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor in Pleural Effusions. *Chest* 2002;121(3):815-820.
52. José Manuel Porcel, Manuel Vives and Aureli Esquerda. Tumor Necrosis Factor-a in Pleural Fluid: A Marker of Complicated Parapneumonic Effusions. *Chest* 2004;125(1):160-164.
53. Odeh M., Sabo E., Oliven A. et al. Role of tumor necrosis factor-a in the differential diagnosis of parapneumonic effusion. *Int J Infect Dis* 1999;4:38-41.



