

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**Π.Σ.Ε. ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ**

**ΘΕΜΑ: Προσδιορισμός της αδενοσινοδεαμινάσης (ADA) στο  
πλευριτικό υγρό και στο αίμα ασθενών  
με υπεζωκοτική συλλογή**



**Διπλωματική Εργασία**  
**Εκπόνηση: Θεόδωρος Κυρόπουλος**

**Λάρισα**  
**Δεκέμβριος 2002**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ  
Ημερομ. ...07.01.2003...  
Αριθ. Πρωτ. ...2457...



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

Αριθ. Εισ.: 1959/1

Ημερ. Εισ.: 31/1/03

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ

2002

ΚΥΡ

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**Π.Σ.Ε. ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ**

**Διπλωματική Εργασία**  
**Εκπόνηση: Θεόδωρος Κυρόπουλος**

**ΘΕΜΑ: Προσδιορισμός της αδενοσινοδεαμινάσης (ADA) στο  
πλευριτικό υγρό και στο αίμα ασθενών  
με υπεζωκοτική συλλογή**



**Υπεύθυνος Καθηγητής: Κων/νος Γουργουλιάνης, Αν. Καθηγητής**  
**Δ/ντής Πνευμονολογικής Κλινικής Π.Π.Γ.Ν.Α.**

**Τριμελής Επιτροπή:**

**Κων/νος Γουργουλιάνης, Αν. Καθηγητής Φυσιολογίας**  
**Έλενα Γεωργιάτσου, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας**  
**Χρύσα Χατζόγλου, Λέκτορας Φυσιολογίας**

**Λάρισα**  
**Δεκέμβριος 2002**



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ ΔΙΔΑΚΤΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΩΝ

ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΜΑΘΗΤΕΣ  
ΓΕΩΜΕΤΡΙΑ

ΕΠΙΜΕΛΕΤΕΣ  
ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΒΙΒΛΙΟ  
ΓΕΩΜΕΤΡΙΑ



ΕΚΔΟΣΗ 1992

ΕΚΔΟΣΗ 1992

ΕΚΔΟΣΗ 1992

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Ιουλίου-Νοεμβρίου 2002 στη πνευμονολογική κλινική και στο Βιοχημικό τμήμα του Π.Π.Γ.Ν.Α. Προηγήθηκε η εκπαίδευση μου, τον Ιούνιο, σχετικά με την εφαρμογή και τη χρησιμότητα της μεθόδου, στο Βιοχημικό τμήμα του Ν.Ν.Θ. “Η ΣΩΤΗΡΙΑ” με τη μεσολάβηση του Δ/ντή της Πνευμονολογικής Κλινικής του Π.Π.Γ.Ν.Α. Αναπληρωτή Καθηγητή Κων/νο Γουργουλιάνη, ο οποίος καθόρισε και το θέμα της εργασίας.

Αισθάνομαι την υποχρέωση να εκφράσω τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου σε όσους συνέβαλλαν στην πραγματοποίησή της.

Ευχαριστώ,

- ▶ Τον Αναπληρωτή Καθηγητή, Κων/νο Γουργουλιάνη, Δ/ντή της Πνευμονολογικής Κλινικής του Π.Π.Γ.Ν.Α., κάτω από τη συνεχή καθοδήγηση και την ακούραστη υποστήριξη του οποίου εργάστηκα όλο αυτό το διάστημα. Τον ευχαριστώ θερμά για την επιστημονική βοήθεια, τις συμβουλές και τις πολύτιμες παρατηρήσεις του.
- ▶ Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Σοφία Μπονάνου-Τζεδάκη, για τη βοήθεια, τη συμπαράσταση και την εξαιρετική διδακτική της παρουσία όλα τα χρόνια των σπουδών μου.
- ▶ Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ανοσολογίας, Αναστάσιο Γερμενή, για τη βοήθεια του στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων.
- ▶ Την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας, της Ιατρικής Σχολής του Π.Θ. Έλενα Γεωργιάτσου, για την κριτική ανάγνωση της εργασίας αυτής ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής.
- ▶ Την Λέκτορα Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Π.Θ. Χρύσα Χατζόγλου, για την κριτική ανάγνωση της εργασίας αυτής, ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής.
- ▶ Την Μικροβιολόγο, Επιμελήτρια Α΄, Ελένη Νταμάνη, Υπεύθυνη του Βιοχημικού Εργαστηρίου του Π.Π.Γ.Ν.Α. για την θερμή της υποστήριξη και την επιστημονική της καθοδήγηση κατά τη πορεία εξέλιξης αυτής της εργασίας καθώς και για τη βοήθεια που μου προσέφερε στο εργαστηριακό μέρος.

- ▶ Την Dr Ιωάννα Σαμαρά, Βιοχημικό, στο Ν.Ν.Θ. “Η ΣΩΤΗΡΙΑ” η οποία με μεγάλη προθυμία μου μετέδωσε τις γνώσεις της, για την εργαστηριακή εφαρμογή και τη χρησιμότητα της εκπόνησης αυτής της εργασίας.
- ▶ Τον Dr Σπύρο Λάφη, Χημικό, Επιστημονικό Συνεργάτη του Π.Σ.Ε. Ιατρική Βιοχημεία για την εξαιρετη τεχνική υποστήριξη του.
- ▶ Την Βιοπαθολόγο Χατζητάκη Μαρία, Επιστημονική υπεύθυνο του Κέντρου Αιμοδοσίας του Γ.Ν.Α. για τη βοήθεια της στη χορήγηση αίματος από εθελοντές αιμοδότες.
- ▶ Τους Ιατρούς των κλινικών, Πνευμονολογικής, Παν./Παθ. και Παθ./Ε.Σ.Υ. για τη βοήθεια τους στη συλλογή των παθολογικών δειγμάτων.
- ▶ Το προσωπικό της γραμματείας του Π.Σ.Ε. Ιατρική Βιοχημεία κ. Ηλία Βαλιάκο και κα. Ευαγγελία Νούσιου για όλη τη βοήθεια τους στα διαδικαστικά θέματα που αφορούσαν αυτή την εργασία.
- ▶ Τον φίλο Δημήτρη Νικούλη για την πολύπλευρη συμπαράσταση και υποστήριξή του.
- ▶ Την οικογένεια μου για τη διαρκή τους υποστήριξη. Η κριτική, οι συμβουλές και η ενθάρρυνση που μου παρείχαν στις σωστές αναλογίες, μου έδιναν δύναμη σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
<b>1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	1
<b>2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	2
<b>3. ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ</b>	3
<b>3.1. Ανατομία</b>	3
<b>3.2. Υπεζωκοτικές συλλογές</b>	4
<b>3.3. Σχηματισμός και απορρόφηση του πλευριτικού υγρού</b>	4
<b>3.4. Παθοφυσιολογία παραγωγής του πλευριτικού υγρού</b>	6
<b>3.5. Ανάλυση του πλευριτικού υγρού</b>	7
<b>4. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΕΥΡΙΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ</b>	9
<b>4.1. Φυματιώδης υπεζωκοτική συλλογή</b>	9
<b>4.2. Κακοήθεια</b>	11
<b>4.3. Καρδιακή ανεπάρκεια</b>	11
<b>4.4. Πνευμονία</b>	11
<b>4.5. Ρευματοειδής αρθρίτιδα</b>	12
<b>5. ΑΔΕΝΟΣΙΝΟΔΕΑΜΙΝΑΣΗ (ADA-EC 3.5.4.4.)</b>	13
<b>5.1. Κατανομή του ενζύμου</b>	13
<b>5.2. Ισοένζυμα της αδενοσινοδεαμινάσης</b>	15
<b>5.3. Δομή της ADA και του γονιδίου της</b>	16
<b>5.4. Ανεπάρκεια της αδενοσινοδεαμινάσης</b>	17
<b>5.5. Διαγνωστική αξία της αδενοσινοδεαμινάσης</b>	18
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (Σκοπός της εργασίας)</b>	19
<b>6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	20
<b>6.1. Αντιδραστήρια</b>	20
<b>6.2. Διαλύματα</b>	20
<b>6.3. Διατήρηση και αποθήκευση των διαλυμάτων</b>	20
<b>6.4. Εξοπλισμός</b>	21
<b>6.5. Έλεγχος γραμμικότητας του φωτομέτρου</b>	21

<b>6.6. Μέθοδος προσδιορισμού αδενοσινοδεαμινάσης (ADA)</b>	22
<b>7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΔΕΝΟΣΙΝΟΔΕΑΜΙΝΑΣΗΣ (ADA)</b>	23
7.1. Προσδιορισμός της ADA στον ορό, σε δείγματα φαινομενικά υγιών (αιμοδότες)	23
7.2. Εσωτερικός έλεγχος ποιότητας	24
7.3. Προσδιορισμός της ADA στο πλευριτικό υγρό και στον ορό ασθενών με υπεζωκοτική συλλογή	25
7.3.1. Ασθενείς	25
7.3.2. Φυματίωση	25
7.3.3. Κακοήθεια	25
7.3.4. Πνευμονία	25
7.3.5. Διάφορα	27
7.3.6. Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια	27
<b>8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	27
<b>9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	30
<b>10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	32
<b>11. ABSTRACT</b>	33
<b>12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	34



## 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθεί η διαγνωστική αξία προσδιορισμού της αδενοσινοδεαμινάσης (ADA) στο πλευριτικό υγρό και τον ορό δεδομένου ότι η ADA έχει μεγάλη εγκυρότητα στη διάγνωση της φυματιώδους πλευρίτιδας καθώς και στον διαχωρισμό μεταξύ του διδρώματος από το εξίδρωμα.

Η ADA προσδιορίστηκε με φωτόμετρο στα 620 nm με τη μέθοδο του Giusti. Πρώτα προσδιορίστηκε το εύρος τιμών της ADA (13,40 – 23,70 U/lit) στον ορό 200 φαινομενικά υγιών (αιμοδοτών) και παράλληλα ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα της μεθόδου (C.V.=1,90%) μετρώντας 50 δείγματα (οροί ελέγχου) από το ίδιο μίγμα ορού. Η δραστηριότητα της ADA μετρήθηκε σε 37 ασθενείς με υπεζωκοτική συλλογή στο πλευριτικό υγρό και στο αίμα. Η σύγκριση των τιμών της ADA με την τελική διάγνωση έδειξε ότι υψηλότερη μέση τιμή ADA πλευριτικού υγρού είχε η φυματίωση (84 U/lit) σε σχέση με την κακοήθεια (20 U/lit), πνευμονία (29 U/lit), διάφορα (16,5 U/lit) και καρδιακή ανεπάρκεια (6 U/lit) ( $p=0,000$ ). Τιμές ADA πλευριτικού υγρού μεγαλύτερες των 48 U/lit έθεταν τη διάγνωση φυματιώσεων με ευαισθησία 100% και ειδικότητα 97%. Και στον ορό η μέση τιμή της ADA στη φυματίωση (35 U/lit) ήταν μεγαλύτερη από τις άλλες ομάδες, κακοήθεια (23 U/lit), πνευμονία (26 U/lit), διάφορα (22 U/lit) και καρδιακή ανεπάρκεια (25 U/lit) ( $p=0,000$ ). Στον ορό τιμές ADA μεγαλύτερες από 28 U/lit θέτουν τη διάγνωση φυματιώσεων με ευαισθησία 86% και ειδικότητα 80%. Ο λόγος της τιμής της ADA στο πλευριτικό υγρό προς την αντίστοιχη του ορού βρέθηκε σημαντικά υψηλότερος στη φυματίωση (2,5 U/lit) από ότι στην κακοήθεια (0,89 U/lit), πνευμονία (1,20 U/lit), διάφορα (0,90 U/lit) και καρδιακή ανεπάρκεια (0,32 U/lit), ( $p=0,000$ ). Η ευαισθησία και ειδικότητα της ADA του πλευριτικού υγρού προς την ADA του ορού για τη διάγνωση της φυματιώδους πλευρίτιδας, με όριο την τιμή των 1,60 U/lit είναι 86% και 90% αντίστοιχα.

Συμπερασματικά φαίνεται ότι, η μέτρηση της ADA στο πλευριτικό υγρό και στον ορό των ασθενών βοηθά σε μεγάλο βαθμό στη διαφοροδιάγνωση της φυματιώδους από άλλες αιτίες υπεζωκοτικών συλλογών, αλλά και στο διαχωρισμό του διδρώματος από το εξίδρωμα, ενώ επιπλέον μπορεί να γίνει γρήγορα και οικονομικά.

## 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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 ευθύνεται 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 ερυθρεμάδη λύκο, την ρευματοειδή αρθρίτιδα, ή και σαν επακόλουθο αντίδρασης σε κάποια φάρμακα<sup>2</sup>.

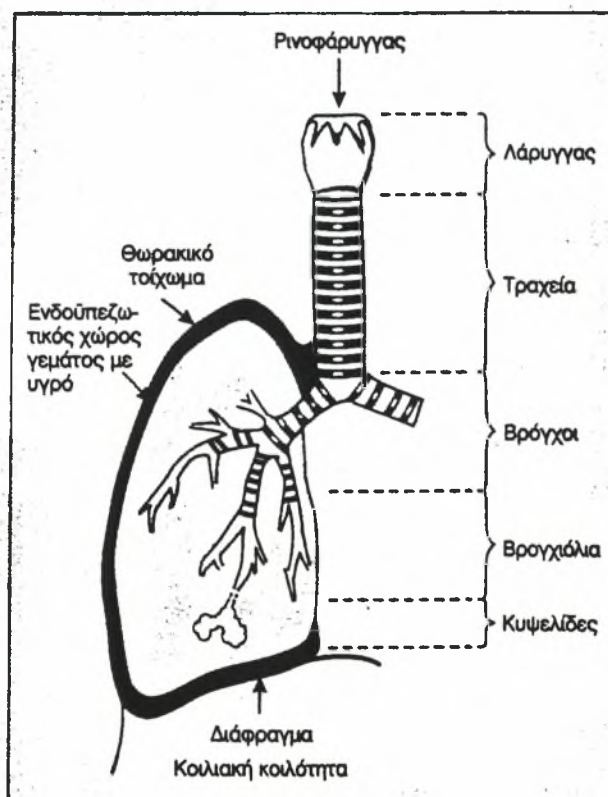
Η παρουσία του πλευριτικού υγρού προσφέρει στον κλινικό γιατρό την δυνατότητα να διαγνώσει, από αυτό, την υπεύθυνη νόσο σε ένα μεγάλο ποσοστό περιπτώσεων. Με τη βοήθεια διαφόρων βιοχημικών εξετάσεων (микροβιολογικών, βιοχημικών, κυτταρολογικών) και τη κλινική εικόνα του ασθενούς, μπορούμε να έχουμε διάγνωση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

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να ελεγχθεί η αξία των επιπέδων της αδενοσινοδεαμινάσης (ADA) στο πλευριτικό υγρό και το αίμα για τη διάγνωση της υπεζωκοτικής συλλογής.

### 3. ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ

#### 3.1. Ανατομία

Η υπεζωκοτική κοιλότητα ορίζεται από το τοιχωματικό και το σπλαγγχνικό πέταλο του υπεζωκότα. Ο τοιχωματικός υπεζωκότας καλύπτει το θωρακικό τοίχωμα, το διάφραγμα και το μεσαύλιο, ενώ ο σπλαγγχνικός τον πνεύμονα. Τα δύο πέταλα συνέρχονται στη πύλη του πνεύμονα, όπου διέρχονται τα πνευμονικά - βρογχικά αγγεία, οι στελεχιαίοι βρόγχοι και τα λεμφαγγεία (Εικόνα 1)



**Εικόνα 1.** Δεξιός πνεύμονας. Ενδοϋπεζωκοτικό υγρό συγκρατεί τον πνευμονικό και τοιχωματικό υπεζωκότα σε επαφή. (J. G. McGeown: Συνοπτική Φυσιολογία του Ανθρώπου, pp 101).

Ο υπεζωκότας είναι ένας λεπτός ημιδιαφανής υμένας που συνίσταται από βασική μεμβράνη, μονήρη στιβάδα μεσοθηλιακών κυττάρων, αγγεία και συνδετικό ιστό. Νευρικές απολήξεις παρατηρούνται μόνο στο τοιχωματικό του πέταλο. Ο υπεζωκοτικός χώρος συμπεριφέρεται ως διάμεσος χώρος, εντός του οποίου ενδέχεται

να συγκεντρωθούν μεγάλες ποσότητες υγρού. Φυσιολογικά στην υπεζωκοτική κοιλότητα εύρους 10-20mm, υπάρχει μικρή ποσότητα υγρού. Το υγρό αυτό αποτελεί κυριολεκτικά “υπερδιήθημα” του αίματος, είναι διαυγές, άχρωμο, με λίγα κύτταρα ( $1500-2000/mm^3$ ) και μικρή ποσότητα πρωτεΐνης ( $<1,5g/100ml$ ). Ακόμη το πλευριτικό υγρό περιέχει νάτριο, κάλιο και ασβέστιο σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με του ενδοκυττάριου υγρού. Η συγκέντρωση των μεγαλομοριακών πρωτεϊνών όπως η γαλακτική δεϋδρογονάση (MB 134.000) στο πλευριτικό υγρό είναι μικρότερη από το 50% της συγκέντρωσης στο αίμα<sup>2,4</sup>.

### **3.2. Υπεζωκοτικές συλλογές**

Ως υπεζωκοτική συλλογή χαρακτηρίζεται η αύξηση του πλευριτικού υγρού εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας. Για τη συλλογή αυτή ευθύνονται διαταραχές στη σχέση παραγωγής-απορρόφησης του πλευριτικού υγρού<sup>2</sup>.

Οι υπεζωκοτικές συλλογές διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες: Τις εξιδρωματικές και τις διδρωματικές.

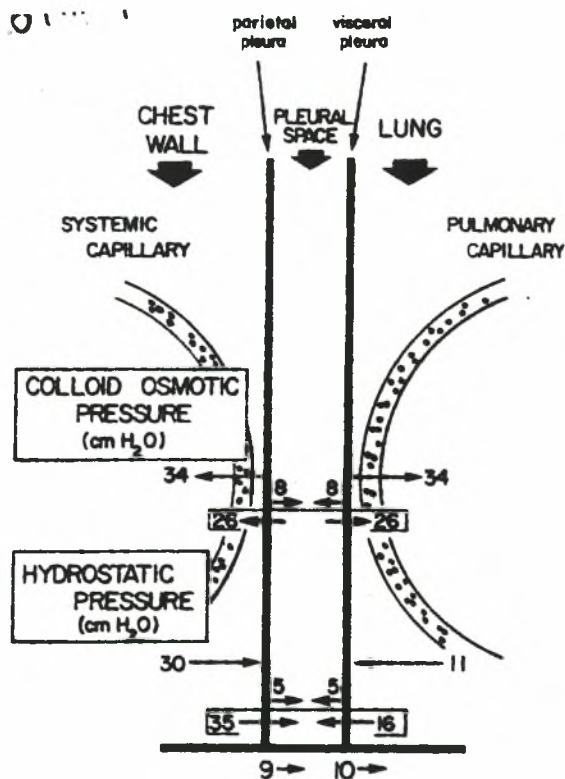
Οι εξιδρωματικές είναι το αποτέλεσμα φλεγμονής του υπεζωκότα (πλευρίτιδες) και χαρακτηρίζονται από αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδών σε μεγαλομοριακές ενώσεις (λευκώματα). Στις διδρωματικές ο υπεζωκότας είναι αμέτοχος και η διήθηση οφείλεται στην αύξηση της πίεσης διήθησης (υδροστατική-κολοειδωσμοτική) στα τριχοειδή του<sup>2</sup>.

### **3.3. Σχηματισμός και απορρόφηση του πλευριτικού υγρού**

Η ποσότητα του πλευριτικού υγρού που υπάρχει σε ένα υγιές άτομο ποικίλει από ένα κυβικό εκατοστό (στην πλειοψηφία) μέχρι 20 κυβικά εκατοστά.

Στα υγιή άτομα, ο σχηματισμός και η απορρόφηση του πλευριτικού υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα ακολουθούν την εξίσωση του Starling και εξαρτώνται από ένα συνδυασμό πιέσεων υδροστατικών, κολοειδωσμοτικών και πιέσεων μεταξύ των ιστών. Οι πιέσεις μεταξύ των ιστών δεν είναι γνωστές, αλλά από τη γνώση των δύο πρώτων φαίνεται ότι στα υγιή άτομα το πλευριτικό υγρό σχηματίζεται στο τοιχωματικό πέταλο του υπεζωκότα και απορροφάται από το περισπλάχνιο. Η καθαρή υδροστατική πίεση που ωθεί το υγρό έξω από το τοιχωματικό πέταλο είναι αλγεβρικό άθροισμα της υδροστατικής πίεσης στα τριχοειδή που αιματώνουν το

τοιχωματικό πέταλο (30cm H<sub>2</sub>O) και της πλευρικής πίεσης (-5cm H<sub>2</sub>O). Έτσι η απόλυτη τιμή της υδροστατικής πίεσης είναι 35cm H<sub>2</sub>O. Η κολλοειδωσμοτική πίεση στα συστηματικά τριχοειδή είναι 34cm H<sub>2</sub>O και στην υπεζωκοτική κοιλότητα 8cm H<sub>2</sub>O με αλγεβρικό άθροισμα 26cm H<sub>2</sub>O κολλοειδωσμοτικής πίεσης και με φορά από την υπεζωκοτική κοιλότητα προς τα τριχοειδή του τοιχωματικού πετάλου. Η διαφορά των δύο αυτών πιέσεων (35-26 = 9cm H<sub>2</sub>O) έχει φορά από το τοιχωματικό πέταλο προς την υπεζωκοτική κοιλότητα. Το περισπλάγχνιο πέταλο, σε όλη του την έκταση εκτός από την περιοχή του μεσοθωράκιου, αιματώνεται από τα τριχοειδή της πνευμονικής κυκλοφορίας, των οποίων η υδροστατική πίεση είναι περίπου 11cm H<sub>2</sub>O. Έτσι η καθαρή υδροστατική πίεση από το περισπλάγχνιο πέταλο προς την υπεζωκοτική κοιλότητα είναι 16cm H<sub>2</sub>O (11-(-5cm) ). Η κολλοειδωσμοτική πίεση παραμένει σταθερή (26cm στην υπεζωκοτική κοιλότητα). Η διαφορά των δύο αυτών πιέσεων είναι 10cm H<sub>2</sub>O (26-16cm) και με φορά προς τα τριχοειδή του περισπλάγγχνιου πετάλου της υπεζωκοτικής κοιλότητας<sup>1, 5</sup> (Εικόνα 2).



**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).

### 3.4. Παθοφυσιολογία παραγωγής του πλευριτικού υγρού

Η παραγωγή του πλευριτικού 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 τη συστηματική κυκλοφορία, το φλεβικό δίκτυο του τοιχωματικού καταλήγει στην άνω-κάτω κοίλη φλέβα, ενώ του σπλαγγχνικού στις χαμηλότερης πίεσης πνευμονικές φλέβες.

Αλλά και η παροχέτευση του πλευρικού χώρου επιτελείται κατά κύριο λόγο από τον τοιχωματικό υπεζωκότα μέσω ανοιγμάτων εύρους 2-12μm που συνέχονται με λεμφοκόλπους και αυτοί με τη σειρά τους με λεμφαγγεία που καταλήγουν στους λεμφαδένες του μεσαυλίου. Ανάλογα ανοίγματα δεν υφίστανται στο σπλαγγχνικό υπεζωκότα<sup>1,4</sup>.

Ο σχηματισμός μεγάλης ποσότητας πλευριτικού υγρού μπορεί να οφείλεται σε ένα ή περισσότερους από τους παρακάτω έξι μηχανισμούς<sup>1,6</sup>.

1. Αύξηση της υδροστατικής πίεσης στη μικροκυκλοφορία του υπεζωκότα.
2. Καταστάσεις που ευθύνονται για μείωση της ογκωτικής πίεσης στη μικροκυκλοφορία. Ασθενείς με χαμηλή συγκέντρωση λευκωματίνης ορού, έχουν αυξημένη τάση σχηματισμού μεσοκυττάριου υγρού.
3. Μηχανισμοί που προκαλούν ελάττωση της πίεσης στην υπεζωκοτική κοιλότητα.
4. Καταστάσεις που ευθύνονται για αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδών αγγείων.
5. Παράγοντες εξ αιτίας των οποίων έχουμε ανεπαρκή απομάκρυνση του υγρού από το λεμφαγγειακό δίκτυο (π.χ. εξαιτίας όγκου ή ίνωσης).
6. Παθητική μετακίνηση του περιτοναϊκού υγρού μέσω διαφραγματικών ελλειμμάτων λόγω της υφιστάμενης διαφοράς πίεσης μεταξύ περιτοναϊκής και υπεζωκοτικής κοιλότητας.

### 3.5. Ανάλυση του πλευριτικού υγρού

Η παρουσία του πλευριτικού υγρού προσφέρει τη δυνατότητα στον κλινικό γιατρό να λάβει με παρακέντηση δείγμα υγρού, προκειμένου να ελέγξει την αιτία συσσώρευσης του.

Έχει προταθεί η πραγματοποίηση κάποιων εξετάσεων του πλευριτικού υγρού με σκοπό να βοηθηθεί ο κλινικός γιατρός στη διάγνωση της υποκείμενης νόσου. Στην πραγματικότητα λίγες είναι οι εξετάσεις που μπορούν να βοηθήσουν στο χαρακτηρισμό και την διάγνωση των υπεζωκοτικών συλλογών, ενώ στο μεγαλύτερο μέρος τους απλά υποστηρίζουν μια κλινική εντύπωση. Εξετάσεις που μπορούν να βοηθήσουν στη διάγνωση είναι:

Τα **μακροσκοπικά χαρακτηριστικά** του πλευριτικού υγρού (χρώμα, οσμή, ιξώδες, θολερότητα) αποτελούν τα πρώτα στοιχεία εκτίμησης της συλλογής<sup>2</sup>.

Ο προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών και της γαλακτικής δεϋδρογονάσης (LDH) ταυτόχρονα στο πλευριτικό υγρό και στο αίμα αποτελεί το πρώτο βήμα για τη διάκριση του **εξιδρώματος** ή **διιδρώματος**. Τα εξιδρώματα έχουν τουλάχιστον ένα και τα διιδρώματα κανένα από από τα παρακάτω τρία κριτήρια, γνωστά και σαν κριτήρια του Light<sup>7</sup>:

i- Η σχέση των πρωτεϊνών του πλευριτικού υγρού προς τις πρωτεΐνες του ορού είναι  $>0,5$ .

ii- Η σχέση της LDH του πλευριτικού υγρού της την LDH του ορού είναι  $>0,6$ .

iii- Τα επίπεδα της LDH του πλευριτικού υγρού είναι  $>2/3$  των ανωτέρων φυσιολογικών τιμών του ορού.

Με την εκτίμηση των λευκωμάτων και της LDH ολοκληρώνεται ο έλεγχος του υπεζωκότα στο 35-40% των συλλογών, δηλαδή των διιδρωμάτων και στη συνέχεια αντιμετωπίζεται η κύρια νόσος.

Ο **αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων** στο πλευριτικό υγρό δεν είναι ιδιαίτερα διαγνωστικός. Παρ' όλα αυτά, τιμές μεγαλύτερες των 10.000/ml προσδίδουν σοβαρές φλεγμονές του υπεζωκότα (εμπύημα) και άλλες οξείες καταστάσεις, ενώ σε χρόνια εξιδρώματα (νεοπλασίες, φυματίωση) ο αριθμός των λευκών δεν ξεπερνά τις 5.000/ml<sup>2, 8</sup>.

Ο **τύπος των λευκών** αντίθετα με τον αριθμό έχει καθοριστική σημασία στη διάκριση των πλευρίτιδων. Σε οξείες καταστάσεις προέχουν τα πολυμορφοπύρρηνα, ενώ σε χρόνιες τα λεμφοκύτταρα. Χαρακτηριστικά στη φυματιώδη πλευρίτιδα τα λεμφοκύτταρα ανέρχονται στο 85-90% του συνόλου των κυττάρων<sup>2, 4, 8</sup>.

Τα επίπεδα της **γλυκόζης** στα διδρώματα και στα περισσότερα εξιδρώματα είναι παρόμοια με αυτά του αίματος. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη (<60mg/100ml) χαρακτηρίζει όλες τις παραπνευμονικές συλλογές και τη ρευματοειδή πλευρίτιδα. Επίσης χαμηλή τιμή γλυκόζης απαντάται της νεοπλασίες (30%) και στις φυματιώδεις πλευρίτιδες (20%). Οι χαμηλότερες τιμές απαντώνται στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και στο εμπύημα<sup>2, 4, 8</sup>.

Η τιμή του **Ph** στο πλευριτικό υγρό υγιών ατόμων είναι 7,60, υψηλότερη δηλαδή της τιμής του Ph του αίματος. Χαμηλή τιμή Ph (<7,30) σε συνδυασμό με φυσιολογικές τιμές Ph αίματος απαντώνται στις συλλογές εκείνες που χαρακτηρίζονται από χαμηλή τιμή γλυκόζης και υψηλή LDH (έντονη φλεγμονή υπεζωκότα)<sup>2, 4</sup>.

Η τιμή της **αμυλάσης** η οποία όταν υπερβαίνει την αντίστοιχη του αίματος βοηθά στη διαφορική διάγνωση των νεοπλασματικών πλευρίτιδων (10%)<sup>2</sup>.

Η **κυτταρολογική εξέταση** του πλευριτικού υγρού επισφραγίζει τη διάγνωση των νεοπλασματικών συλλογών σε ποσοστό που ξεπερνάει το 50% των ασθενών. Το ποσοστό αυτό φθάνει στο 80-90% με την τρίτη δειγματοληψία<sup>2, 4</sup>.

Προσδιορισμός των **ανοσιακών δεικτών** οι οποίοι συμβάλλουν αποφασιστικά στη διάγνωση της πλευρίτιδας του ερυθρηματώδους λύκου και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας<sup>2</sup>.

Προσδιορισμός του **αιματοκρίτη** σε περίπτωση που το πλευριτικό υγρό φαίνεται μακροσκοπικά ως αιμορραγικό<sup>2</sup>.

Ανάλυση των **λιπιδίων** (τριγλυκερίδια, χοληστερόλη, ανάλυση λιποπρωτεϊνών) όταν το πλευριτικό υγρό είναι θολερό βοηθά στη διαφορική διάγνωση μεταξύ εμπυήματος χυλοθώρακα και ψευδοχυλοθώρακα<sup>2</sup>.



## 4. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΕΥΡΙΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

### 4.1. Φυματιώδης υπεζωκοτική συλλογή

Σύμφωνα με τα στοιχεία της παγκόσμιας οργάνωσης υγείας το ένα τρίτο του πληθυσμού της Γης έχει μολυνθεί από τον βάκιλο της φυματίωσης. Από αυτούς, 8-10 εκατομμύρια εκδηλώνουν τη νόσο κάθε χρόνο, και τα 3 εκατομμύρια πεθαίνουν. Ο βάκιλος της φυματίωσης θεωρείται σήμερα υπεύθυνος για περισσότερους θανάτους από οποιοδήποτε άλλο παθογόνο μικροοργανισμό και συγκεκριμένα για το ένα τέταρτο των θανάτων που με άλλες συνθήκες θα μπορούσαν να είχαν αποφευχθεί. Η επίπτωση της φυματίωσης αυξάνεται σε πολλές βιομηχανικά ανεπτυγμένες καθώς και σε αναπτυσσόμενες χώρες και λόγω της αύξησης του πληθυσμού, υπάρχουν σήμερα περισσότερα κρούσματα φυματίωσης από οποιαδήποτε άλλη στιγμή της ανθρώπινης ιστορίας<sup>9, 10</sup>.

Οι προσπάθειες για την καταπολέμηση της νόσου έχουν στηριχθεί αφ' ενός στη προσπάθεια βελτίωσης της κοινωνικοοικονομικής κατάστασης και των συνθηκών υγιεινής σε παγκόσμια κλίμακα και αφ' ετέρου στην επιστημονική έρευνα. Σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες η μείωση του άλλοτε υψηλού αριθμού κρουσμάτων άρχισε από τα τέλη του περασμένου αιώνα. Ο μαζικός εμβολιασμός με BCG από το 1921 και η χρήση των αντιφυματικών φαρμάκων από το 1950 απλά επιτάχυναν τους ρυθμούς μείωσης των κρουσμάτων αυτών<sup>9</sup>.

Σε πολλές χώρες του αναπτυσσόμενου αλλά και του ανεπτυγμένου κόσμου η φυματίωση παραμένει η πιο συχνή αιτία υπεζωκοτικής συλλογής χωρίς εμφανή πνευμονική νόσο. Η φυματιώδης πλευρίτιδα παρατηρείται συχνότερα στους νέους με τη μορφή της μη επιλεγμένης υπεζωκοτικής συλλογής<sup>11</sup>.

Επίσης παρατηρείται συχνότερα στους ενήλικες παρά στα παιδιά σαν εκδήλωση πρωτοπαθούς φυματίωσης. Έχει αναφερθεί συλλογή υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα μόνο στο 10% παιδιών που έπασχαν από φυματίωση, ενώ αντίστοιχα σε ενήλικες το ποσοστό ανέρχεται σε 38%<sup>12</sup>.

Η φυματιώδης πλευρίτιδα παρατηρείται συνήθως μέσα σε έξι μήνες από την πρωτοπαθή λοίμωξη, συνοδεύοντας την εμφάνιση της κυτταρικής ανοσίας. Θεωρείται αντιδραστική εκδήλωση της επιβραδυνόμενης υπερευαισθησίας σε ένα μικρό αριθμό

βακίλλων, που προκαλούν οξεία φλεγμονώδη αντίδραση στην υπεζωκοτική κοιλότητα<sup>13</sup>.

Το πλευριτικό υγρό είναι συνήθως καθαρό, αργυρόχρωμο και περιέχει πάνω από 3,0 γραμμάρια λευκώματος ανά 100 κυβικά εκατοστά. Σπάνια είναι αιμορραγικό ή ακόμα και ροδόχρωμο. Η εξέταση του με την χρώση κατά Wright, αποτελεί μια από τις χρησιμότερες δοκιμασίες. Η τιμή γλυκόζης στο 60% των περιπτώσεων είναι χαμηλότερη από 60mg/100ml, ενώ η LDH έχει τιμή μεγαλύτερη από 200 μονάδες ανά λίτρο. Κατά τη μικροσκοπική εξέταση του πλευριτικού υγρού παρατηρούνται κρύσταλλοι χοληστερόλης στο 30 – 70% των περιπτώσεων που είναι θετικοί σε οξεάντοχο βάκλλο. Ο αριθμός των κυττάρων στο 5% ανέρχεται περίπου σε 10.000 ερυθρά και στο 75% σε 1.000 λευκοκύτταρα περίπου τα οποία είναι κυρίως λεμφοκύτταρα. Στη φυματιώδη πλευριτική συλλογή δεν παρατηρούνται μεσοθηλιακά κύτταρα κατά την κυτταρολογική εξέταση του πλευριτικού στο 75% των ασθενών κάτω από 25 ετών και στο 50% των ασθενών πάνω από την ηλικία των 25. Η καλλιέργεια του πλευριτικού υγρού είναι θετική στο 10 –70% των περιπτώσεων και το ειδικό του βάρος είναι 1016<sup>5,8</sup>.

Ο υπολογισμός της ADA του πλευριτικού υγρού και η διαπίστωση τιμών μεγαλύτερων των 38 IU/L είναι ουσιαστικός για τη διαφοροδιάγνωση της φυματιώδους πλευριτικής συλλογής. Η υψηλότερη δραστηριότητα της ADA στο πλευριτικό υγρό ασθενών με φυματιώδη πλευρίτιδα – σε σχέση με το αίμα – οφείλεται πιθανότατα στη σύνθεση της από κύτταρα μέσα στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Μεγάλες συγκεντρώσεις ADA βρέθηκαν στα T- λεμφοκύτταρα. Αυτό, σε συνδυασμό με την αυξημένη αναλογία T- λεμφοκυττάρων στο πλευριτικό υγρό, υποστηρίζει την τοπική κυτταρική ανοσολογική απάντηση ως αιτία των υψηλών τιμών ADA στη φυματίωση<sup>14</sup>.

Η φυματιώδης πλευρίτιδα αποτελεί ένα καλό παράδειγμα επιτυχημένης κυτταρικής ανοσολογικής απάντησης, δεδομένου ότι η νόσος είναι συνήθως αυτοπεριοριζόμενη. Αν και υπάρχει δηλαδή συχνά έντονη φλεγμονώδης απάντηση που εκδηλώνεται με ίνωση του υπεζωκότα, της περισσότερες φορές η νόσος υποχωρεί χωρίς θεραπεία. Τα T- λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα ενορχηστρώνουν την ανοσολογική απάντηση στην φυματίωση γενικά και στην φυματιώδη πλευρίτιδα ειδικότερα. Και τα δύο είδη κυττάρων είναι σήμερα γνωστό ότι συμμετέχουν σε κάθε

είδους ανοσολογική απάντηση και παράγουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που προκαλούν τοπικά και συστηματικά συμπτώματα<sup>15</sup>.

Η μελέτη των T- λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων από το πλευριτικό υγρό ασθενών με φυματιώδη πλευρίτιδα, δίνει την ευκαιρία να μελετηθεί η φλεγμονώδης κυτταρική αντίδραση στην περιοχή της ενεργού νόσου<sup>15</sup>.

#### **4.2. Κακοήθεια**

Το πλευριτικό υγρό είναι ροδόχρωμο και περιέχει στο 90% των περιπτώσεων λευκώματα πάνω από 3,0 γραμμάρια ανά 100 κυβικά εκατοστά. Η γλυκόζη σπάνια έχει τιμή χαμηλότερη από 60mg/100ml και οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάζουν οξέωση με Ph χαμηλότερο από 7,30. Η κυτταρολογική εξέταση είναι θετική στο 30 – 40% και ο αριθμός των κυττάρων στο 40% είναι περίπου 1.000 λευκοκύτταρα (κυρίως λεμφοκύτταρα). Το ειδικό βάρος στο 75% είναι 1016. Η τιμή της αδενοσινοδεαμινάσης παρουσιάζει μια μέση τιμή 21U/L και αξιολογείται μόνο σε συνδυασμό με άλλες βιοχημικές εξετάσεις όπως το σάκχαρο ή ο τύπος των κυττάρων<sup>5</sup>.

#### **4.3. Καρδιακή ανεπάρκεια**

Το πλευριτικό υγρό είναι καθαρό (ορώδες) και τα λευκώματα που περιέχει είναι χαμηλότερα από 3,0 γραμμάρια ανά 100 κυβικά εκατοστά. Η γλυκόζη έχει φυσιολογικές τιμές και η LDH είναι χαμηλότερη από 200 μονάδες ανά λίτρο. Ο τύπος των κυττάρων είναι 10% ερυθρά και 10% λευκοκύτταρα (περίπου 1.000), και το ειδικό βάρος στο 90% κάτω από 1016. Η τιμή της ADA είναι πολύ χαμηλή με μια μέση τιμή περίπου 4U/L<sup>5</sup>.

#### **4.4. Πνευμονία**

Το πλευριτικό υγρό είναι ορώδες και τα λευκώματα που περιέχει είναι 3,0 γραμμάρια ή περισσότερο ανά 100 κυβικά εκατοστά. Η γλυκόζη είναι συνήθως χαμηλότερη από 60mg/100ml και το ειδικό βάρος είναι 1016. Η μικροσκοπική εξέταση του πλευριτικού υγρού μπορεί ή όχι να είναι θετική για βάκιλλους, όπως μπορεί ή όχι να

είναι θετική και η καλλιέργεια του πλευριτικού υγρού. Στον τύπο των κυττάρων επικρατούν τα πολυμορφοπύρρηνα. Η μέση τιμή της ADA είναι 28U/L<sup>13</sup>.

#### **4.5. Ρευματοειδής αρθρίτιδα**

Το πλευριτικό υγρό είναι θολερό ή κιτρινοπράσινο με ειδικό βάρος 1016. Η τιμή των λευκωμάτων είναι 3,0 γραμμάρια ή και περισσότερο ανά 100 κυβικά εκατοστά, ενώ η τιμή της γλυκόζης είναι κάτω από 20mg/100ml. Στη ρευματοειδή αρθρίτιδα επικρατούν τα λεμφοκύτταρα και η τιμή της αδενοσινοδεαμινάσης είναι χαρακτηριστικά υψηλή (> από 80U/L) παίζοντας καθοριστικό ρόλο στη διάκριση από τον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο<sup>5,16</sup>.

## 5. ΑΔΕΝΟΣΙΝΟΔΕΑΜΙΝΑΣΗ ( Αδενοσινοαμινοϋδρολάση, ADA-EC 3.5.4.4. )

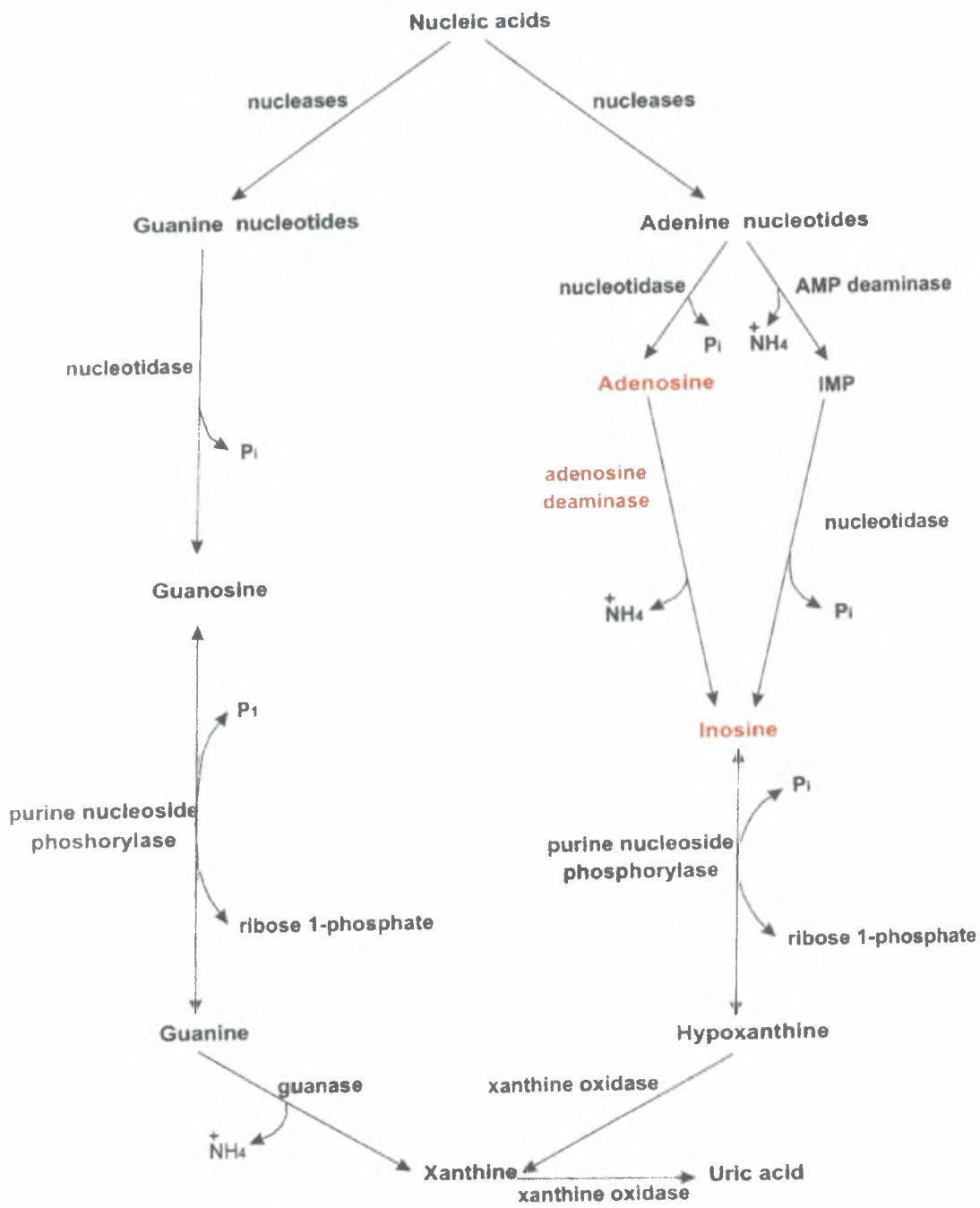
### 5.1. Κατανομή του φυσιολογικού ενζύμου

Η αδενοσινοδεαμινάση (ADA) είναι ένα ένζυμο του καταβολισμού των πουρινών και καταλύει την μη αντιστρεπτή απαμίνωση της αδενοσίνης και της δεοξυαδενοσίνης σε ινοσίνη και 2' δεοξυαδενοσίνη<sup>15</sup> (Εικόνα 3).

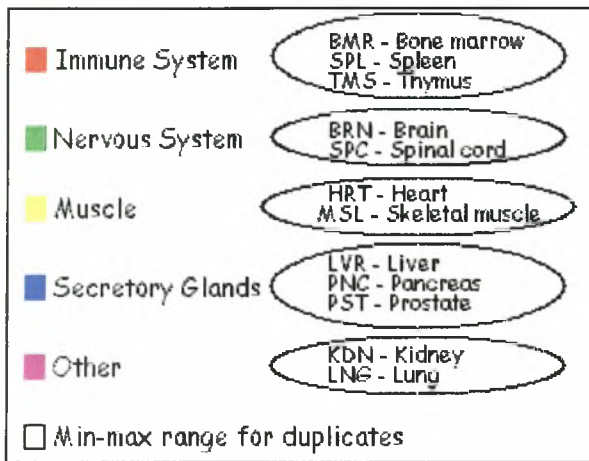
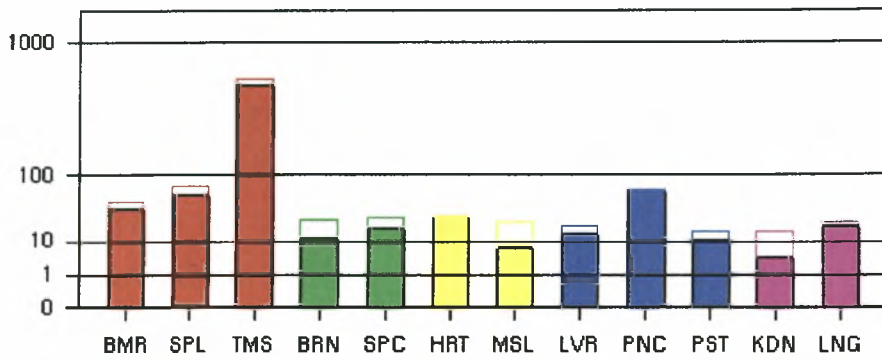
Το ένζυμο είναι κατανεμημένο παντού στους ιστούς και παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δραστηριότητα στον θύμο (~800 IU/mg πρωτεΐνης) και τη χαμηλότερη στα ερυθροκύτταρα (~1IU/mg)<sup>17, 18</sup>. Επίσης σημαντική δραστηριότητα παρουσιάζει στο έντερο, το σπλήνα, τους πνεύμονες και ήπαρ ενώ πολύ μικρή είναι η δραστηριότητα της (ADA) στους σκελετικούς μυς, το δέρμα και τα οστά<sup>14</sup> (Εικόνα 4).

Ιδιαίτερα σημαντικός όμως είναι ο ρόλος της αδενοσινοδεαμινάσης και στον λεμφικό ιστό. Τα επίπεδα της ADA είναι δέκα φορές υψηλότερα στα λεμφοκύτταρα από ότι στα ερυθροκύτταρα, και ειδικά στα T- λεμφοκύτταρα όπου υπάρχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζύμου ανάλογα και με την κυτταρική διαφοροποίηση. Έτσι φαίνεται ότι η δραστηριότητα της αδενοσινοδεαμινάσης ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με την διαφοροποίηση των T- λεμφοκυττάρων. Στα T- λεμφοκύτταρα του ανθρώπου έχει παρατηρηθεί σημαντικά υψηλότερη δραστηριότητα του ενζύμου (5-10 φορές περισσότερη) από ότι στα B- λεμφοκύτταρα<sup>19</sup>.

Η έλλειψη της δραστηριότητας του ενζύμου οφείλεται σε επίκτητη ή γενετικά καθορισμένη διαταραχή του ανοσολογικού συστήματος<sup>20</sup>. Τα επίπεδα του ενζύμου αυξάνονται σε ασθενείς με διαφορετικούς τύπους καρκίνου αλλά μειώνονται σε ασθενείς με λευχαιμία. Αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου στο αίμα βρέθηκε σε ασθενείς με ιογενή ηπατίτιδα και λοιμώδη μονοπυρήνωση και στο πλευριτικό, περιτοναϊκό και εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) σε ασθενείς με φυματίωση<sup>21, 22</sup>.



Εικόνα 3. Χημική αποικοδόμηση των πουρινών. (Thomas M. Devlin: Textbook of Biochemistry, Fourth Edition, pp 502).



**Εικόνα 4.** Κατανομή της ADA στους ιστούς του ανθρώπου σε IU/mg πρωτεΐνης (file://A:/GeneCard for ADA.htm.).

## 5.2. Ισοένζυμα της αδενοσινοδεαμινάσης

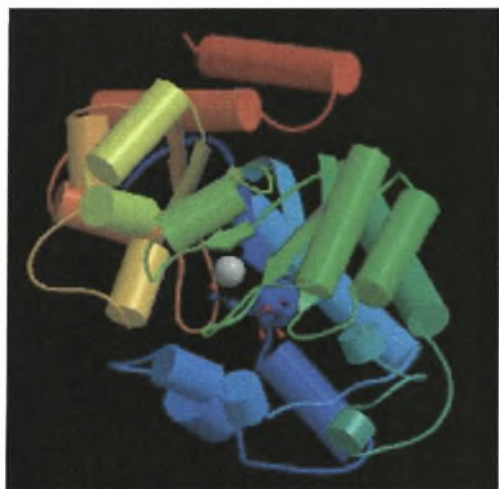
Η δραστηριότητα της ADA στα βιολογικά υγρά οφείλεται στη δράση δύο ισοενζύμων, της ADA-1 και ADA-2. Το ισοένζυμο ADA-1 είναι μια μονομερής πρωτεΐνη με μοριακή μάζα ~35 KDA που κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα 20. Φυσιολογικά η ADA-1 βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στον ορό. Ο φυσικός της εντοπισμός είναι μέσα στα κύτταρα ιδίως στα λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα και ερυθροκύτταρα και είναι ουσιαστική για μια ικανοποιητική ανοσολογική απάντηση. Συγγενής απουσία της ADA-1 στα λεμφοκύτταρα και στα ερυθροκύτταρα προκαλεί σοβαρό σύνδρομο ανασοανεπάρκειας<sup>23,24,25</sup>.

Το ισοένζυμο ADA-2 έχει μοριακή μάζα ~100 KDA και κωδικοποιείται από ένα ξεχωριστό γονιδιακό τόπο (locus). Η ADA-2 βρίσκεται μόνο στα μακροφάγα και απελευθερώνεται μετά από διέγερση των κυττάρων αυτών λόγω της παρουσίας μικροοργανισμών σε αυτά<sup>23,26</sup>.

Η ADA-2 διαφέρει από την ADA-1 όχι μόνο ως προς τη μοριακή μάζα αλλά και ως προς τις ενζυμικές ιδιότητες. Έτσι το ισοένζυμο ADA-2 συγκρινόμενο με το ισοένζυμο ADA-1 έχει χαμηλότερο βέλτιστο pH (6,5 έναντι 7,5 της ADA-1), υψηλότερη  $K_m$  για την αδενοσίνη (2000  $\mu\text{mol/l}$  έναντι 50  $\mu\text{mol/l}$ ) και χαμηλότερη απαμινωτική δράση για την 2'-δεοξαδενοσίνη σε σύγκριση με την αδενοσίνη (αριθμητική σχέση 0,2 έναντι 0,8)<sup>27</sup>.

### 5.3. Δομή της ADA και του γονιδίου της

Η ADA από αρκετούς ιστούς του ανθρώπου που απομονώθηκε είναι μια μονή πεπτιδική αλυσίδα με εκτιμώμενο μοριακό βάρος 36.000–44.000<sup>28,29</sup>. Κρυσταλλογραφική ανάλυση ανασυνδυασμένης μυϊκής ADA με διακριτικότητα 2,4 Å αποκάλυψε μια αρχιτεκτονική παράλληλων  $\alpha/\beta$  κυλίνδρων, με 8 κεντρικές  $\beta$  αλυσίδες και 8 περιφερικές  $\alpha$  έλικες<sup>30, 31</sup>. Κάθε μόριο ADA περιείχε ένα πολύ στενά συνδεδεμένο άτομο ψευδαργύρου βαθιά μέσα στη κρύπτη του ενεργού κέντρου (Εικόνα 5).



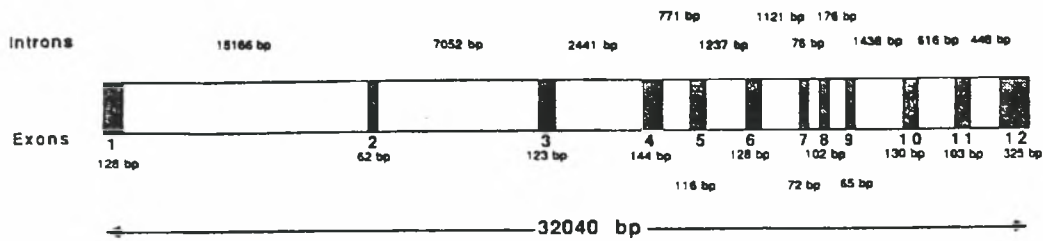
Εικόνα 5. Τριτοταγής δομή της ADA (file://A:/Structure Explorer - ADA.htm).

Ο ρόλος του ψευδαργύρου φαίνεται ότι είναι ουσιαστικός για την καταλυτική δραστηριότητα<sup>32</sup>. Τα άτομα του ψευδαργύρου συντονίζονται με τρεις ιστιδίνες και ένα ασπαρτικό. Μεταλλαγένεση *in vitro* τριών από αυτά τα υπολείμματα ( $\text{His}_{17}$ ,  $\text{His}_{214}$  &  $\text{Asp}_{295}$ ) εξαλείφει τη δράση της ADA. Μια μετάλλαξη του τέταρτου υπολείμματος ( $\text{His}_{17} \rightarrow \text{Asp}_{295}$ ) ήταν υπεύθυνη για την ανεπάρκεια σε ασθενή με SCID<sup>30, 32</sup>.





Ο γονιδιακός τόπος (locus) βρίσκεται στον επιμήκη βραχίονα του ανθρώπινου χρωμοσώματος 20, και ειδικότερα στην περιοχή 20q13.11. Το γονίδιο περιέχει 12 εξόνια, διαχωριζόμενα από 11 ιντρόνια. Τα εξόνια ποικίλουν σε μέγεθος από 62 – 325 bp, ενώ τα ιντρόνια είναι μεγέθους 76 – 15.000 bp<sup>33</sup> (Εικόνα 6).



### Human ADA gene

**Εικόνα 6.** Το ανθρώπινο γονίδιο της ADA. (C. R. Scriver, A. L. Beadet, et al : The metabolic and molecular bases of inherited disease, pp 1731.

#### 5.4. Ανεπάρκεια της αδενοσινοδεαμινάσης

Η ανεπάρκεια της δράσης της απαμινάσης της αδενοσίνης στους ανθρώπους συνδέεται με μια αυτοσωμική υπολειπόμενη μορφή σοβαρής συνδυασμένης ανεπάρκειας SCID (Giblett et al 1972, Martin & Gelfand 1981, Thomson & Seegmiller 1980) που περιλαμβάνει δυσλειτουργία T και συνήθως B κυττάρων<sup>34</sup>.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η έλλειψη της απαμινάσης της αδενοσίνης παρεμβάλλεται στην ανοσολογική λειτουργία δεν είναι πλήρως κατανοητός. Έχει δειχτεί πάντως ότι σε ένα ασθενή με ανεπάρκεια της απαμινάσης της αδενοσίνης υπάρχει συγκεντρωμένο τριφωσφορικό δεοξυαδενοσίνης (dATP) στα εξετασθέντα ερυθροκύτταρα. Στη πραγματικότητα η συγκέντρωση dATP είναι μεγαλύτερη από αυτή του ATP σε αυτά τα κύτταρα. Πιστεύεται λοιπόν ότι η αποτυχία των κυττάρων να μεταβολίζουν δεοξυαδενοσίνη σε δεοξυινοσίνη για επιπλέον μετατροπή σε υποξανθίνη οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα dATP. Το dATP είναι γνωστό ως ένας πολύ αποτελεσματικός αναστολέας της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγάσης και επομένως της σύνθεσης του DNA (κυτταρικός αναδιπλασιασμός). Πιστεύεται ότι αυτή είναι η εξήγηση για την ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς η ενεργοποίηση μιας ανοσολογικής απάντησης απαιτεί πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων<sup>35</sup>.

Άλλες προτάσεις περιλαμβάνουν ότι η αυξημένη αδενοσίνη είναι τοξική για τα κύτταρα επί τη βάσει της ικανότητας της να αυξάνει τις ενδοκυτταρικές

συγκεντρώσεις του cAMP ή εξαιτίας της αναστολής της S-αδενοσυλ-ομοκυστεϊνικής υδρολάσης οδηγώντας σε αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα S-αδενοσυλ-L-ομοκυστεϊνης.

Δεν είναι σαφές το πώς η ανεπάρκεια οδηγεί σε ανοσολογικά προβλήματα. Πάντως είναι σαφές ότι ελαττώματα σε ένζυμα - που τυχαία έχουν μελετηθεί στα μεταβολικά μονοπάτια κατά το παρελθόν - αποκαλύπτουν τη σημασία τους στο φυσιολογικό μεταβολισμό όταν είναι απόντα ή πολύ μειωμένα<sup>34,35</sup>.

### 5.5. Διαγνωστική αξία της αδενοσινοδεαμινάσης

Ο προσδιορισμός της ADA στο πλευριτικό υγρό έχει μεγάλη εγκυρότητα στη διάγνωση της φυματιώδους πλευρίτιδας. Ο υπολογισμός της ADA του πλευριτικού υγρού και η ανεύρεση τιμών μεγαλύτερων των 38 μονάδων ανά λίτρο θέτει τη διάγνωση στο 100% των ασθενών με ιστολογικά διαγνωσμένη φυματιώδη πλευρίτιδα<sup>14</sup>.

Ο προσδιορισμός της ADA παρέχει επίσης τη δυνατότητα ασφαλούς διαχωρισμού διδρώματος από εξίδρωμα συνδυάζοντας τις τιμές της ADA του πλευριτικού υγρού και της ADA του αίματος<sup>14,22</sup>.

Η υψηλή τιμή της ADA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διακριθεί η υπεζωκοτική συλλογή της ρευματοειδούς αρθρίτιδας από άλλες κολλαγονώσεις όπως του συστηματικού ερυθματώδους λύκου, όπου η τιμή της ADA δεν είναι αυξημένη<sup>22,36</sup>.

Επίσης η χρήση άλλων δοκιμασιών όπως το σάκχαρο, τα λευκώματα, η LDH ή ο τύπος των κυττάρων μπορούν σε συνδυασμό με την ADA να βοηθήσουν στη διαφορική διάγνωση της υπεζωκοτικής συλλογής<sup>22</sup>.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να εκτιμηθεί κατά πόσον τα επίπεδα της ADA στο πλευριτικό υγρό και στον ορό θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη διαφοροδιάγνωση των υπεζωκοτικών συλλογών δεδομένου ότι η ADA έχει μεγάλη εγκυρότητα στη διάγνωση της φυματιώδους αιτιολογίας υπεζωκοτικής συλλογής καθώς και στο διαχωρισμό του διδρώματος από το εξίδρωμα

Αυτό επιτεύχθηκε με την εγκατάσταση στο Π.Π.Γ.Ν.Α. της μεθόδου του Giusti, η οποία είναι αξιόπιστη, η τεχνική της είναι απλή και είναι οικονομική.

## 6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 6.1. Αντιδραστήρια

Η προμήθεια των προτύπων ουσιών έγινε από τη Sigma (Steinheim, Germany).

1. Δισόξινο Φωσφορικό Νάτριο,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
2. Όξινο Φωσφορικό Νάτριο,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
3. Αδενοσίνη, κρυσταλλική, χρωματογραφικώς καθαρή.
4. Φαινόλη, A. R.
5. Νιτροπρωσσικό Νάτριο,  $\text{Na}_2(\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , A.R.
6. Υποχλωριώδες νάτριο,  $\text{NaOCl}$ .
7. Υδροξείδιο του Νατρίου,  $\text{NaOH}$  1N.
8. Θεικό Αμμώνιο,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

### 6.2. Διαλύματα

- I. Buffer Φωσφορικών (50 mM : pH 6,5).
- II. Διάλυμα Αδενοσίνης ρυθμιζόμενο με φωσφορικά (21 mM adenosine, 50 mM phosphate, pH 6,5).
- III. Θεικό Αμμώνιο, πρότυπο διάλυμα (stock solution, 15 mM).
- IV. Θεικό αμμώνιο, διάλυμα εργασίας (standard solution 75  $\mu\text{M}$ ).
- V. Διάλυμα Φαινόλης/Νιτροπρωσσικού (106 mM Φαινόλη, 0,17 mM Νιτροπρωσσικό Νάτριο).
- VI. Αλκαλικό υποχλωριώδες διάλυμα (11 mM  $\text{NaOCl}$ , 125 mM  $\text{NaOH}$ ).

### 6.3. Διατήρηση και αποθήκευση των διαλυμάτων

Η διατήρηση όλων των διαλυμάτων γίνεται στους 0-4 °C, ενώ τα διαλύματα I, II, IV και V θα πρέπει να τοποθετούνται σε σκούρα δοχεία. Η σταθερότητα των διαλυμάτων διαρκεί τουλάχιστον 2 μήνες με εξαίρεση το διάλυμα της αδενοσίνης (II) το οποίο θα πρέπει να παρασκευάζεται την ημέρα των μετρήσεων σε ποσότητα ανάλογη με τα προς εξέταση δείγματα<sup>37</sup>.

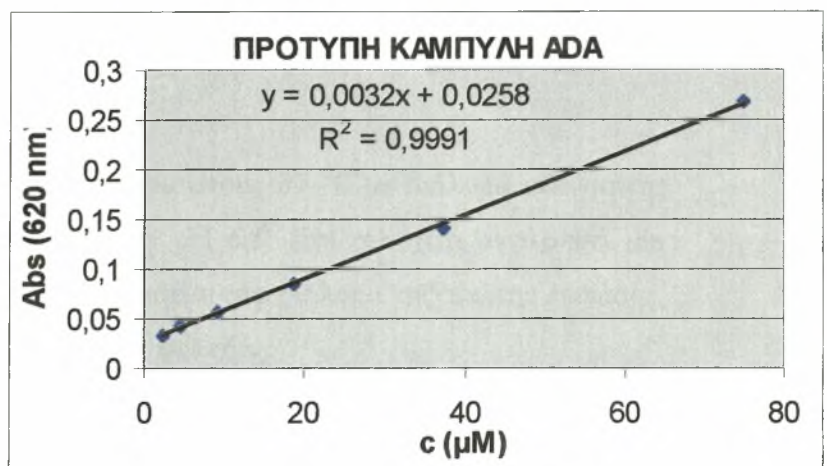
#### 6.4. Εξοπλισμός

1. Αναλυτικός ζυγός – Gibertini (Gibertini Elettronica SRL, Milano, Italy).
2. Φυγόκεντρος – Heraeus instruments (Function Line, Labofuge 400).
3. Φωτόμετρο συνεχούς ροής Microlab 200 (MERK).
4. Υδατόλουτρο.

#### 6.5. Έλεγχος γραμμικότητας του φωτομέτρου

Ο έλεγχος γραμμικότητας του φωτομέτρου προηγήθηκε των μετρήσεων των δειγμάτων για τον προσδιορισμό της αδενοσινοδεαμινάσης. Η γραμμικότητα ελέγχθηκε με τη χρήση υποδιπλάσιων αραιώσεων του διαλύματος εργασίας (standard solution). Από το διάγραμμα (Εικόνα 7) φαίνεται ότι το φωτόμετρο μας δίνει αξιόπιστες τιμές απορρόφησης που είναι ανάλογες με τη συγκέντρωση του διαλύματος εργασίας.

Abs 620 nm	C (μM)
0,033	2,34
0,043	4,68
0,057	9,37
0,085	18,75
0,141	37,5
0,268	75



Εικόνα 7. Έλεγχος γραμμικότητας του φωτομέτρου με τη χρήση υποδιπλάσιων αραιώσεων του διαλύματος εργασίας (standard solution).

## 6.6. Μέθοδος προσδιορισμού αδενοσινοδεαμινάσης (ADA)

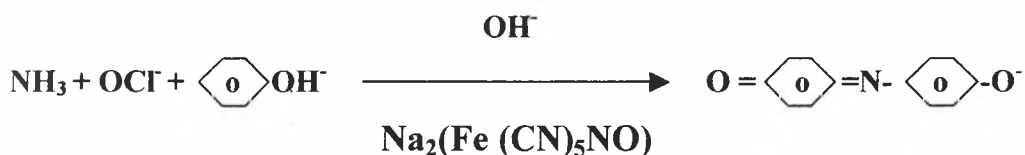
Ο μέτρηση της αδενοσινοδεαμινάσης έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του Giusti<sup>37</sup>.

### Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της ADA στηρίζεται στην υδρόλυση της αδενοσίνης σε ινοσίνη και αμμωνία, υδρόλυση που καταλύεται από αυτό ακριβώς το ένζυμο.



Η αμμωνία αντιδρά με υποχλωριώδες νάτριο και φαινόλη σε αλκαλικό περιβάλλον και με την παρουσία νιτροπρωσσικού νατρίου, παράγεται έγχρωμο (μπλε) σύμπλοκο της ινδοφαινόλης:



Το δείγμα επώάζεται κατ' αρχάς για μια ώρα στους 37 °C με διάλυμα αδενοσίνης 21mM σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6,5. Στη συνέχεια ακολουθεί μία δεύτερη επώαση στους 37 °C αφού προσθέσουμε στο διάλυμα της πρώτης επώασης, αντιδραστήριο που αποτελείται από ίσα μέρη των εξής:

**A)** Νιτροπρωσσικό νάτριο (106 mM φαινόλη – 0,17 Mm νιτροπρωσσικό νάτριο).

**B)** Αλκαλικό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (11 mM NaCl- 125 Mm NaOH).

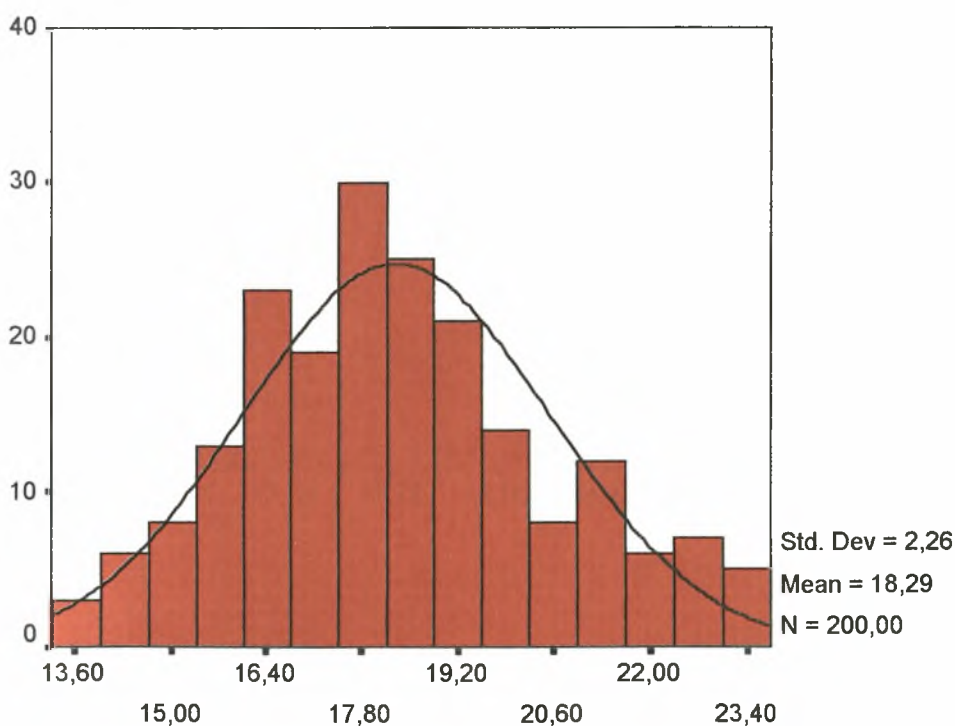
Η αμμωνία που παράγεται κατά την πρώτη ώρα της επώασης σχηματίζει με τα αντιδραστήρια αυτά ινδοφαινόλη. Η οπτική πυκνότητα του διαλύματος μετράται στα 620 nm μετά από την παρέλευση άλλης μισής ώρας (δεύτερη επώαση) και συγκρίνεται με την οπτική πυκνότητα διαλύματος ινδοφαινόλης που παράγεται από πρότυπο διάλυμα αμμωνίας με γνωστή συγκέντρωση.

## 7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΔΕΝΟΣΙΝΟΔΕΑΜΙΝΑΣΗΣ (ADA)

Η αδενοσινιδεαμινάση μετρήθηκε στο βιοχημικό εργαστήριο του Π.Π.Γ.Ν.Α. Η ADA παρουσιάζει υψηλή σταθερότητα η οποία ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες: τουλάχιστον μία ημέρα σε θερμοκρασία δωματίου και περισσότερο από μια εβδομάδα σε θερμοκρασία 4 °C. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία<sup>37</sup>.

### 7.1. Προσδιορισμός της αδενοσινοδεαμινάσης (ADA) στον ορό, σε δείγματα φαινομενικά υγιών (αιμοδοτές).

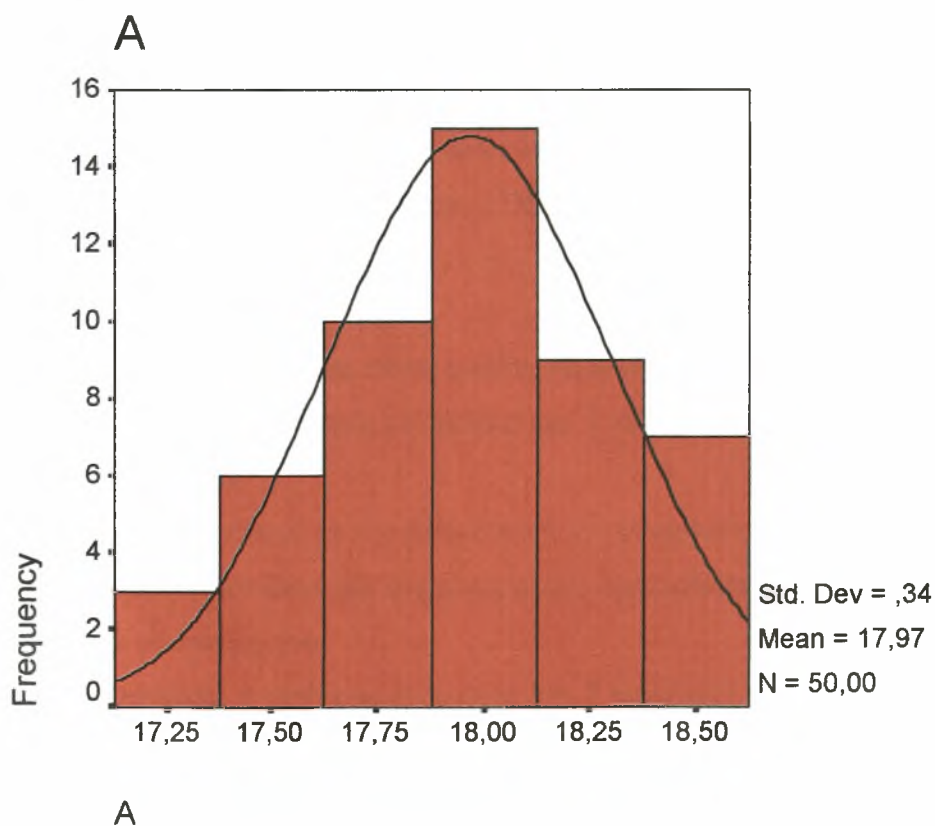
Σαν στόχο είχε να υπολογιστεί το εύρος των φυσιολογικών τιμών στον ορό υγιών ατόμων. Μετρήθηκαν 200 δείγματα (123 άνδρες και 77 γυναίκες) ηλικίας 22 έως 57 ετών (μέση ηλικία 34 έτη) τα οποία προέρχονταν από το τμήμα αιμοδοσίας του Γ.Ν.Α. Το εύρος τιμών κυμάνθηκε μεταξύ 13,40 και 23,70 U/lit ( $\bar{X}=18,29 \pm 2,26$  U/lit). Η κατανομή φαίνεται στην εικόνα 8.



Εικόνα 8. Διάγραμμα στο οποίο φαίνεται η κατανομή και το εύρος τιμών της ADA στα δείγματα φαινομενικά υγιών (αιμοδοτών).

## 7.2. Εσωτερικός έλεγχος ποιότητας

Ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας έγινε παράλληλα με τον προσδιορισμό της ADA στα δείγματα των αιμοδοτών και σκοπό είχε να μετρηθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου. Πάρθηκε ορός από δέκα εθελοντές που εργάζονται στο βιοχημικό τμήμα του Π.Π.Γ.Ν.Α και αναμίχθηκε. Ο ορός τοποθετήθηκε σε κλειστό δοκιμαστικό σωλήνα και αναδεύτηκε για αρκετή ώρα ώστε να παρθεί ένα ομογενές μίγμα. Στη συνέχεια μοιράστηκε σε erpendorf τα οποία τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη σε θερμοκρασία  $-20^{\circ}\text{C}$  για να χρησιμοποιηθούν ως οροί ελέγχου. Έγιναν συνολικά 50 μετρήσεις ορών ελέγχου, 5 για κάθε 20 μετρήσεις σε δείγματα αιμοδοτών (Εικόνα 9) από τις οποίες φαίνεται ότι η μέθοδος έχει μεγάλη επαναληψιμότητα  $C.V.=1,90\%$ ).



Εικόνα 9. Κατανομή των τιμών για τους ορούς ελέγχου.  $C.V.=1,90\%$ .



### 7.3. Προσδιορισμός της αδενοσινοδεαμινάσης (ADA) στο πλευριτικό υγρό και στον ορό ασθενών με υπεζωκοτική συλλογή.

#### 7.3.1. Ασθενείς

Μελετήθηκαν συνολικά 37 ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στη πνευμονολογική, πανεπιστημιακή/παθολογική, πανεπιστημιακή/Ε.Σ.Υ. και καρδιολογική κλινική του Π.Π.Γ.Ν.Α. για διαγνωστική διερεύνηση υπεζωκοτικής συλλογής κατά το χρονικό διάστημα 20-8-2002 έως 21-11-2002. Σε όλους τους ασθενείς συμπληρώθηκε κοινό πρωτόκολλο (Εικόνα 10 ) 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, Τ.Κ.Ε.).
- 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:

**7.3.2. Φυματίωση:** 7 ασθενείς (4 άνδρες και 3 γυναίκες) ηλικίας 35 έως 76 ετών (μέση ηλικία 51 έτη).

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

**7.3.3. Κακοήθεια:** 6 ασθενείς (4 άνδρες και 2 γυναίκες) ηλικίας 53 έως 78 ετών (μέση ηλικία 68 έτη).

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

**7.3.4. Πνευμονία:** 7 ασθενείς (5 άνδρες και 2 γυναίκες) ηλικίας 31 έως 78 ετών (μέση ηλικία 60 έτη).

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

Α/α: .....

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ: \_\_\_\_\_

ΔΕΙΓΜΑ: Πλευριτικό υγρό  Αίμα

ΚΛΙΝΙΚΗ: .....

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ:.....

ΗΛΙΚΙΑ: .....

ΚΑΠΝΙΣΜΑ (πακέτα/ημέρα Χ 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 10. Πρωτόκολλο για τη διάγνωση υπεζωκοτικής συλλογής.

**7.3.5. Διάφορα:** 9 ασθενείς (6 άνδρες και 3 γυναίκες) ηλικίας 27 έως 76 ετών (μέση ηλικία 62 έτη).

Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει: 1 ασθενή με χρόνια μυελογενή λευχαιμία, 3 με λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού, 3 με αναπνευστική ανεπάρκεια και 2 με πλευρίτιδα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας.

**7.3.6. Συμφορητική Καρδιακή Ανεπάρκεια (Διίδρωμα):** 8 ασθενείς (6 άνδρες και 2 γυναίκες) ηλικίας 61 έως 83 ετών (μέση ηλικία 73 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.

## 8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής καταγράφονται περιληπτικά στους πίνακες 2 και 3 και αναλυτικότερα στις εικόνες 11, 12 και 13. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS.

1) Η ADA του πλευριτικού υγρού των ασθενών με φυματίωση ήταν σε υψηλότερες τιμές ( $\bar{X}=84$  U/lit) σε σχέση με τις τιμές των ασθενών με κακοήθεια ( $\bar{X}=20$  U/lit), με πνευμονία ( $\bar{X}=29$  U/lit), σε σχέση με την ομάδα των διαφόρων ασθενειών ( $\bar{X}=16,5$  U/lit) και με καρδιακή ανεπάρκεια ( $\bar{X}=6$  U/lit) (Πίνακας 2, Εικόνα 11). Όλες οι διαφορές ήταν στατιστικά λίκαν σημαντικές ( $p=0,000$ ). Σύμφωνα με την ROC analysis με όριο την τιμή 48 U/lit η ευαισθησία είναι 100 % και η ειδικότητα 97 % (Πίν. 3).

2) Οι τιμές της αδενοσινοδεαμινάσης του ορού στις ίδιες ομάδες βρέθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στους ασθενείς με φυματίωση ( $\bar{X}=35$  U/lit) σε σχέση με τις τιμές των υπολοίπων ασθενών (κακοήθεια  $\bar{X}=23$  U/lit, πνευμονία  $\bar{X}=26$  U/lit, διάφορα  $\bar{X}=22$  U/lit και καρδιακή ανεπάρκεια  $\bar{X}=25$  U/lit – Πίνακας 2, Εικόνα 12). Όλες οι διαφορές ήταν στατιστικά λίκαν σημαντικές ( $p=0,000$ ). Με όριο την τιμή των 28 U/lit η ευαισθησία είναι 86% και η ειδικότητα 80% (Πίνακας 3).

3) Η τιμή του πηλίκου της αδενοσινοδεαμινάσης του πλευριτικού υγρού προς τη τιμή του ορού στις πέντε ομάδες που μελετήθηκαν είναι: Φυματίωση  $\bar{X}=2,5$  U/lit, κακοήθεια  $\bar{X}=0,89$  U/lit, πνευμονία  $\bar{X}=1,20$  U/lit, διάφορα  $\bar{X}=0,90$  U/lit και καρδιακή ανεπάρκεια  $\bar{X}=0,32$  U/lit (Πίνακας 2, Εικόνα 13). Όλες οι διαφορές ήταν

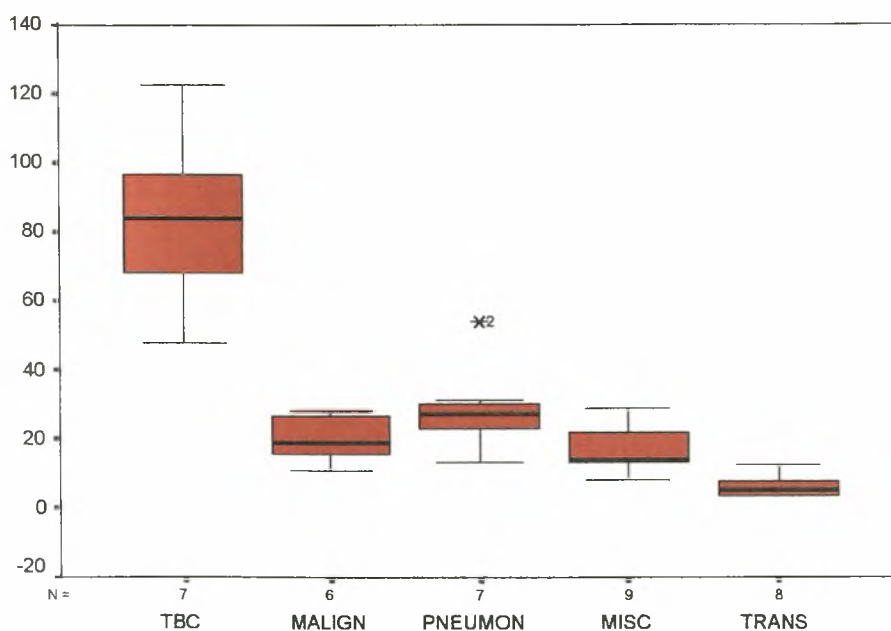
στατιστικά λίαν σημαντικές ( $p=0,000$ ). Βάζοντας ως όριο την τιμή 1,60 U/lt η ευαισθησία είναι 86% και η ειδικότητα 90% (Πίνακας 3).

	Φυματίωση	Κακοήθεια	Πνευμονία	Διάφορα	Διίδρωμα
ADA Π.Υ. U/lit	84 ± 25	20 ± 7	29 ± 13	16,5 ± 6,5	6 ± 3
ADA ΟΡ. U/lit	35 ± 12	23 ± 6	26 ± 8	22 ± 11	25 ± 5
ADA ΠΥ/ΟΡ U/lit	2,5 ± 0,5	0,89 ± 0,30	1,20 ± 0,50	0,90 ± 0,60	0,32 ± 0,30

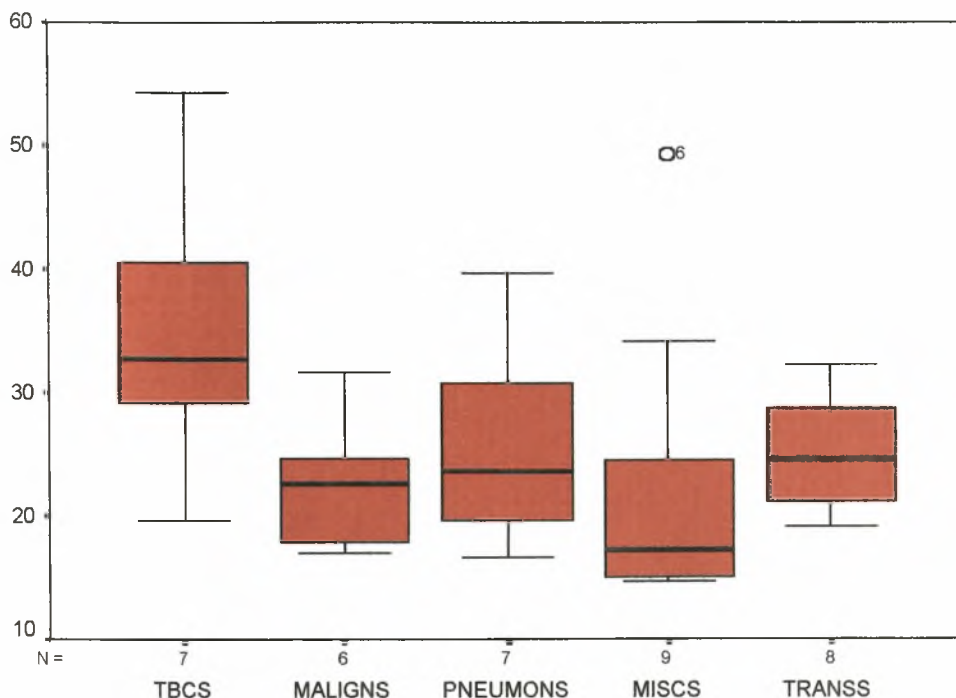
**Πίνακας 2.** Μέσες τιμές και σταθερές αποκλίσεις.

	Οριακή τιμή	Ευαισθησία %	Ειδικότητα
ADA Π.Υ.	>48 U/lit	100	97,0
ADA ΟΡΟΥ	>28 U/lit	86,0	80,0
ADA Π.Υ./ΟΡ.	>1,60 U/lit	86,0	90,0

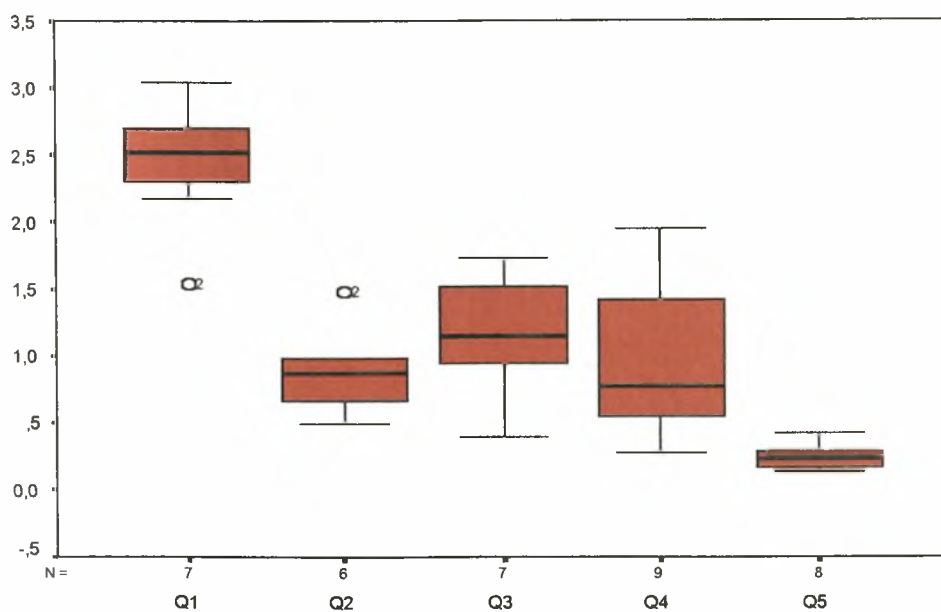
**Πίνακας 3.** Οριακές τιμές, ευαισθησία και ειδικότητα., σύμφωνα με τη ROC analysis.



**Εικόνα 11.** Τιμές ADA πλευρικού υγρού ταξινομημένες κατά νόσημα. TBC = Φυματίωση, MALIGN = Κακοήθεια, PNEUM = Πνευμονία, MISC = Διάφορα , TRANS = Διίδρωμα (Καρδιακή Ανεπάρκεια).



**Εικόνα 12.** Τιμές ADA ορού ταξινομημένες κατά νόσημα. S = Ορός, TBC = Φυματίωση, MALIGN = Κακοήθεια, PNEUM. = Πνευμονία, MISC = Διάφορα, TRNS=Δίδρωμα (Καρδιακή Ανεπάρκεια).



**Εικόνα 13.** Τιμές ADA Π.Υ./ΟΡ ταξινομημένες κατά νόσημα. Q1= Φυματίωση, Q2 = Κακοήθεια, Q3=Πνευμονία, Q4 = Διάφορα, Q5 = Δίδρωμα (Καρδιακή Ανεπάρκεια).

## 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 τη δυνατότητα στους κλινικούς ιατρούς να καθορίζουν σε ποσοστό μέχρι 85% την αιτιολογική διάγνωση της υπεζωκοτικής συλλογής<sup>3</sup>.

Η φυματίωση αποτελεί για μερικές χώρες, όπως η Ελλάδα, μια από τις συχνότερες αιτίες πλευριτικής συλλογής. Η επίπτωση της φυματιώδους πλευρίτιδας κυμαίνεται 1% και 10%<sup>38</sup>. Η διάγνωση της αποτελεί, τις περισσότερες φορές, δύσκολο ιατρικό πρόβλημα. Μυκοβακτηρίδια στο πλευριτικό υγρό, στις πιο αισιόδοξες σειρές, βρέθηκαν στο 20% των ασθενών<sup>39</sup>. Η βιοψία υπεζωκότα φαίνεται ότι είναι για τη χώρα μας ο συχνότερος τρόπος διαγνώσεως. Η λήψη τριών βιοψιών από έμπειρο γιατρό αυξάνει τη διαγνωστική αξία της μεθόδου στο 80% των ασθενών<sup>33</sup>. Η βιοψία υπεζωκότα αποτελεί επεμβατική μέθοδο, μερικές φορές όχι καλά ανεκτή από τον ασθενή. Νέες τεχνικές όπως η ραδιομετρική μέθοδος, οι μετρήσεις αντιγόνων και αντισωμάτων για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης και άλλες έχουν μελετηθεί χωρίς όμως να εξασφαλίζουν την ευαισθησία και ειδικότητα εκείνη που θα τις καθιέρωνε<sup>10</sup>.

Για τους λόγους αυτούς η ανεύρεση διαφόρων κυτταρικών δεικτών που θα μπορούσαν να βοηθήσουν τους κλινικούς ιατρούς στη διάγνωση της φυματιώδους αιτιολογίας πλευριτικής συλλογής είναι αναγκαία.

Το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης εισβάλλει στην υπεζωκοτική κοιλότητα συνηθέστερα μετά από ρήξη υπο-υπεζωκοτικής τυρώδους βλάβης. Πρωτεϊνικά αντιγόνα του βακίλου προκαλούν μια αντίδραση επιβραδυνόμενης υπερευαισθησίας η οποία διεγείρει τα λεμφοκύτταρα. Ακολούθως τα λεμφοκύτταρα απλευθερώνουν διάφορες λεμφοκίνες οι οποίες αφ' ενός ενεργοποιούν τα μακροφάγα και αφ' ετέρου μεταβάλλουν τη διαπερατότητα των αγγείων του υπεζωκότα και συμβάλλουν στο σχηματισμό κοκκιώματος<sup>12</sup>.

Είναι γνωστό ότι η ADA είναι ένας δείκτης κυτταρικής ανοσίας και τα T-λεμφοκύτταρα (όπου έχουν βρεθεί και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ADA) παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ανοσολογική απάντηση που λαμβάνει χώρα στη φυματίωση και γι' αυτό θεωρείται ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της ADA στο

πλευριτικό υγρό φυματιώδους αιτιολογίας και του ολικού αριθμού των λεμφοκυττάρων ή των υποπληθυσμών αυτών<sup>10</sup>. Η υψηλότερη δραστηριότητα της ADA στο πλευριτικό υγρό ασθενών με φυματιώδη πλευρίτιδα - σε σχέση με το αίμα - οφείλεται πιθανότατα στη σύνθεση της από κύτταρα μέσα στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Μεγάλες συγκεντρώσεις ADA βρέθηκαν στα T- λεμφοκύτταρα. Αυτό σε συνδυασμό με την αυξημένη αναλογία T- λεμφοκυττάρων στο πλευριτικό υγρό, υποστηρίζει την τοπική κυτταρική ανοσολογική απάντηση ως αιτία των υψηλών τιμών ADA στη φυματίωση<sup>14</sup>.

Τα επίπεδα της ADA στο πλευριτικό υγρό των φυματικών ασθενών παρά την ευρεία διακύμανση τους (48 – 122,8 U/lit) ήταν εντυπωσιακά υψηλότερα από τις υπόλοιπες ομάδες ασθενών ( $p=0,000$ ). Με την τιμή των 48 U/lit σαν κατώτερο όριο για τον χαρακτηρισμό μιας υπεζωκοτικής συλλογής σαν φυματιώδους, η ευαισθησία έφτασε το 100 % και η ειδικότητα το 97 %. Παρόμοια υψηλά ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας αναφέρονται επίσης στη βιβλιογραφία<sup>19,21,36</sup>. Η διαφωνία επικεντρώνεται στην τιμή της ADA, πάνω από την οποία θα τίθεται με ασφάλεια η διάγνωση της φυματιώδους πλευρίτιδας.

Και στον ορό τα επίπεδα της ADA βρέθηκαν υψηλότερα στους ασθενείς με φυματιώδη υπεζωκοτική συλλογή (19,7 – 54,4 U/lit). Η ευαισθησία φθάνει το 86 % και η ειδικότητα το 80% με όριο τις 28 U/lit κατώτερη τιμή για φυματιώδους αιτιολογίας πλευριτική συλλογή.

Το πηλίκo της αδενoσινιδεαμινάσης του πλευριτικού υγρού προς εκείνη του ορού παρουσιάζει στατιστικά λίαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες ασθενών, με ευαισθησία 86% και ειδικότητα 90 % αν υπολογιστεί η τιμή 1,60 U/lit το κατώτερο όριο για τον χαρακτηρισμό μιας πλευριτικής συλλογής σαν φυματιώδους. Οι τιμές του πηλίκου της ADA του πλευριτικού υγρού προς την ADA του ορού κυμάνθηκαν από 1,54 – 3,4 U/lit στην ομάδα των ασθενών με φυματίωση.

Από τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής φαίνεται επίσης ότι τιμές της ADA στο πλευριτικό υγρό είναι μικρότερες από 12,40 U/lit και η τιμή του λόγου ADA πλευριτικού υγρού προς ADA αίματος είναι μικρότερη από 0,53 στη κατηγορία των ασθενών με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (διίδρωμα) παρέχοντας τη δυνατότητα για ασφαλή διαχωρισμό μεταξύ διιδρώματος – εξιδρώματος.

## 10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μέση τιμή της αδενοσινοδεαμινάσης στο πλευριτικό υγρό, και στον ορό είναι σημαντικά υψηλότερη στη ομάδα των ασθενών με φυματίωση από ότι στις άλλες τέσσερις ομάδες στις οποίες προσδιορίστηκε η ADA. Το ίδιο συμβαίνει και στο λόγο της τιμής της ADA του πλευριτικού υγρού προς την αντίστοιχη του ορού.

Φαίνεται πως ο προσδιορισμός της αδενοσινοδεαμινάσης στο πλευριτικό υγρό και στον ορό των ασθενών μπορεί να μας βοηθήσει με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα στη διαφοροδιάγνωση της φυματιώδους από άλλης αιτίας υπεζωκοτικής συλλογής. Παρέχει επίσης τη δυνατότητα ασφαλούς διαχωρισμού διδρώματος από εξίδρωμα.

Η φωτομετρική μέθοδος του Giusti με την οποία προσδιορίστηκε η αδενοσινοδεαμινάση είναι μια μέθοδος απλή, ταχεία, οικονομική και μπορεί να εκτελείται χωρίς επιβάρυνση του ασθενούς.



## 11. ABSTRACT

The aim of this work is the study of the diagnostic value of defining the adenosine deaminase (ADA) in the pleural fluid and serum in the differential diagnosis of the pleural effusions.

The concentration of ADA was defined using a photometer at 620 nm applying the Giusti method. At first the range of the ADA value (13.40-23.70 U/lit) in serum of 200 apparently healthy blood donors was defined and at the same time the precision of the method (C.V. = 1.90%) was controlled through measuring 50 species (control serums) of the same mixture of serum. The activity of ADA was measured in 37 patients with pleural effusion in the pleural fluid and blood. The comparison of the ADA values with the final diagnosis indicated that tuberculosis presented a higher mean value of ADA pleural fluid (84 U/lit) compared to malignancy (20 U/lit), pneumonia (29 U/lit), miscellaneous (16.5 U/lit) and heart failure (6 U/lit) ( $p=0.000$ ). ADA values of pleural fluid higher than 48 U/lit indicated diagnosis of tuberculosis with a sensitivity 100% and specificity 97%. In serum, also, the mean value of ADA in tuberculosis (35 U/lit) was higher than other groups, malignancy (23 U/lit), pneumonia (26 U/lit), miscellaneous (22 U/lit) and heart failure (25 U/lit) ( $p=0.000$ ). In serum ADA rates higher than 28 U/lit indicated diagnosis of tuberculosis with a sensitivity 86% and specificity 80%. The ratio of the ADA value in pleural fluid to the corresponding in serum was found considerably higher ( $p=0.000$ ) in tuberculosis (2.5 U/lit) than in malignancy (0.89 U/lit), pneumonia (1.20 U/lit), miscellaneous (0.90 U/lit) and heart failure (0.32 U/lit). The sensitivity and specificity of ADA of pleural fluid to the ADA of serum for the diagnosis tuberculous pleuritis was 86% and 90% respectively where the limit was 1.60 U/lit.

In conclusion it appears that the measuring of ADA in pleural fluid and in serum of patients helps to a great extent the differential diagnosis of the tuberculous from other causes of pleural effusions as well as the distinction the transudation from exudates, moreover this measuring can be done quickly and economically.

## 12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 
- <sup>1</sup> Pistolesi M, Miniati M, Giuntini C: Pleural liquid and solute exchange: *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989, 140:825.
- <sup>2</sup> Παθολογία CECIL, τόμος 1 σελ. 521-526.
- <sup>3</sup> Strankinga WFM, Nauta JJP, Straud JP, Stram J. Adenosine deaminase activity in tuberculous pleural effusions: A diagnostic test. *Tubercle* 1987, 68: 137-140.
- <sup>4</sup> CECIL, Textbook of medicine. 19<sup>th</sup> edition, Volume 1, 446.
- <sup>5</sup> J. A. Peter Paré MD, Robert G. Fraser MD. Synopsis of disease of the chest pp 66-67.
- <sup>6</sup> E. Agostoni: Mechanics of the pleural space. *Physiol. Rev.* 1972, 52:57.
- <sup>7</sup> Light RW, MacGregor MI, Luchinger PC et al: Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Int Med*, 1972, 77:507-521.
- <sup>8</sup> Δημήτριος Α. Πάτακας. *Επίτομη Πνευμονολογία*, pp 111, 275-278.
- <sup>9</sup> Kochi A. The global tuberculosis and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle*, 1991, 72:1-6.
- <sup>10</sup> Seibert AF, Haynes J Jr, Middleton R, et al.. Tuberculous pleural effusion: twenty-years experience. *Chest*, 1991, 99:883-886.
- <sup>11</sup> Wagner DC. The clinical presentation of tuberculous disease in children. *Pediatr Ann*, 1993, 22:622-628.
- <sup>12</sup> Valdes L, Alvarez D, San Jose E, et al. Tuberculous pleurisy, a study of 254 patients. *Arch Intern Med* 1998, 158:2017-2021.
- <sup>13</sup> James Penington, MD. *Respiratory Infections Diagnosis and Management*. Third edition, pp 410.
- <sup>14</sup> Κ. Γουργουλιάνης, Δ. Ορφανίδου, Κ. Χατζησταύρου, κ.α.: Η μέτρηση της αδενόσινοδεαμινάσης στη διάγνωση των νόσων των πνευμόνων. *Ιατρική* 1991, 59:387-391.
- <sup>15</sup> Cristalli G, Costanzi S, Lambertucci C, et al: Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors: *Med. Res. Rev.* 2001, 21:105-108.
- <sup>16</sup> Decker JL, Malone DG et al. NIH conference. Rheumatoid arthritis: evolving concepts of pathogenesis and treatment. *Ann Intern Med*, 1984, 101:810-823.
- <sup>17</sup> Van der Weyden MB, Kelley WN: Human adenosine deaminase: distribution and properties. *J Biol. Chem.* 1976, 251:5448-5456.

- 
- <sup>18</sup> Charles R. Scriver, Arthur L. Beadet, et al: The metabolic and molecular bases of inherited disease. Seventh edition, Volume III, Pages 1729-1730.
- <sup>19</sup> Inma Ocana MD, José M. Martínez- Vazquez MD, Rosa M. Segura ScD, et al : Adenosine deaminase in pleural fluids. Test for diagnosis of tuberculous pleura effusion. CHEST 1983, 84:51-53.
- <sup>20</sup> Scott CR, Chen SH, Giblett ER. Detection of the carrier in Combined Immunodeficiency Disease associated with adenosine deaminase deficiency. 1974, 53: 1194-1196.
- <sup>21</sup> Piras MA, Gakis CS, Budroni M, Andrea G. Adenosine deaminase activity in pleura effusions : an aid to differential diagnosis. Br Med J 1978, 1751-1752.
- <sup>22</sup> Κ. Ι. Γουργουλιάνης. Διαγνωστική αξία των βιοχημικών εξετάσεων του πλευριτικού υγρού. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής, 1993, 10:15-19.
- <sup>23</sup> J. P. J. Ungerer, H. M. Oosthuizen, S. H. Bissbort, W. J. H. Vermaak. Serum adenosine deaminase: Isoenzymes and diagnostic application. Clin. Chem. 1992, 38:1322-1326.
- <sup>24</sup> C. Gakis MD, A. Naitana MD, A. Riccardo Ortu Mdet al. Adenosine deaminase activity in the diagnosis of infectious diseases: Infect Med. 1992, 11:216, 219-224, 232.
- <sup>25</sup> Howard Ratech, Rochelle Hiirschhorn. Serum adenosine deaminase in normals and in a patient with adenosine deaminase deficient- severe combined immunodeficiency: Clinica Chimica Acta 1981, 115:341-347.
- <sup>26</sup> Y. P. Kataria MD, I. Khrshid MB. Adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pleural effusion: CHEST 2001, 120:334-335.
- <sup>27</sup> Hiirschhorn R. Conversion of human erythrocyte-adenosine deaminase activity to different tissue- specific isozymes evidence for a catalytic unit. J. Clin. Invest. 1975, 55:661-667.
- <sup>28</sup> Schrader WP, Stacy AR, Pollara B: Purification of human erythrocyte adenosine deaminase by affinity column chromatography. J Biol. Chem. 1976, 251:4026.
- <sup>29</sup> Daddona PE, Kelley WN: Human adenosine deaminase : Purification and subunit structure. J. Biol. Chem. 1977, 252:110.
- <sup>30</sup> Wilson DK, Rudolph FB, Quioco FA: Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: Understanding catalysis and immunodeficiency mutations. Science 1991, 252:1278.

- 
- <sup>31</sup> Sharff AJ, Wilson DK, Chang Z, Quioco FA: Refined 2,5 Å structure of murine adenosine deaminase at pH 6,0. *J. Mol. Biol.* 1992, 226:917.
- <sup>32</sup> Bhaumik D, Medin J, Gathy k, Coleman MS: Mutational analysis of active site residues of human adenosine deaminase. *J. Biol. Chem* 1993, 268:5464.
- <sup>33</sup> D. A. Wiginton, D. J. Kaplan, Christopher S. et al: Complete sequence and structure of the gene for human adenosine deaminase. *Biochemistry* 1986, 25:8234-8244.
- <sup>34</sup> Scrader W P, Pollara B, Meuwissen H J. Characterization of the residual adenosine deaminating activity in the spleen of a patient with combined immunodeficiency disease and adenosine deaminase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978, 75:446-450.
- <sup>35</sup> Akesson A. L. et al. Mutations in the human adenosine deaminase gene that affect protein structure and RNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84:5947.
- <sup>36</sup> Petterson T, Klockars M, Webbe T. Pleural fluid deaminase in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *CHEST*, 1984, 84:273.
- <sup>37</sup> Giuseppe Giusti. *Adenosine Deaminase, methods of enzymatic analysis*: Academic Press, New York 1974, 1092-1099.
- <sup>38</sup> Berger HW, Mejia E. Tuberculous pleurisy. *Chest* 1973, 63:88-92.
- <sup>39</sup> Levine H, Metzger W, Lacera D. Diagnosis of tuberculous pleurisy by culture of pleural biopsy specimen. *Arch Intern Med* 1970, 126:269-271.

ΛΗΞΗ	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΔΑΝΕΙΖΟΜΕΝΟΥ

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ**

Τηλ.: ~~74.760-61~~ ΛΑΡΙΣΑ  
2410-565077  
565078



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057255