

Aktywność deaminazy adenozyiny w gruźliczym i nowotworowym wysięku w opłucnej

Adenosine deaminase activity in tuberculous and malignant pleural effusions

Aleksandra Safianowska¹, Rafał Krenke¹, Barbara Dmowska-Sobstyl²,
Elżbieta Bogacka-Zatorska³, Joanna Domagała-Kulawik¹, Ryszarda Chazan¹

¹ Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii AM w Warszawie.

Kierownik: Prof. dr hab. med. R. Chazan.

² Centralne Laboratorium, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny A M w Warszawie.

Kierownik: Prof. dr hab. med. D. Bobilewicz

³ Katedra i Zakład Anatomii Patologicznej AM w Warszawie. Kierownik: Prof. dr hab. med. A. Wasiutyński

Summary: Measurement of pleural adenosine deaminase activity (ADA) is a useful diagnostic tool for tuberculous pleurisy, but false-positive findings from non-tuberculous effusions have been reported. In order to improve diagnostic value of ADA it is recommended to estimate activity of both ADA1 and ADA2 izoenzymes or 2'-deoxyadenosine/adenosine activity ratio.

In order to evaluate ADA as a diagnostic parameter total ADA, with adenosine as a substrate, and 2'-deoxyadenosine/adenosine activity ratio were measured in tuberculous and malignant pleural effusions. Altogether, 26 pleural exudates (11 tuberculous and 15 malignant) were selected. ADA either with adenosine or 2'-deoxyadenosine was determined by colorimetric method of Giusti. Each pleural fluid sample was diluted prior to the assay (1:8) to avoid enzyme inhibition which was observed in nondiluted pleural effusions. The ADA level reached the diagnostic cut-off set for tuberculous effusions (40 U/L) in every 11 tuberculous exudates with the mean value of $85,3 \pm 47,1$ U/L; in 9 of these the 2'-deoxyadenosine/adenosine ratio was less than 0,45. In the malignant group of patients, no one ADA level exceeded 40 U/L, being estimated at $10,6 \pm 7,7$ U/L ($p < 0,001$). In 10 of these 15 exudates the 2'-deoxyadenosine/adenosine ratio was undetectable, in four it was less than 0,45 and only in one it was over 0,45.

We concluded that ADA measured by the Giusti method proceeded by the dilution 1:8 of the pleural effusion samples very good differentiates tuberculous from malignant pleurisy, without the necessity to determine the 2'-deoxyadenosine/adenosine ratio. The investigation needs to be continued on the more numerous groups of patients.

Pneumonol. Alergol. Pol. 2006, 74, 5:9

Key words: adenosine deaminase activity, tuberculous pleurisy

Aktywność deaminazy adenozyiny (Adenosine Deaminase Activity – ADA) jest parametrem przydatnym w rozpoznaniu gruźliczego wysiękowego zapalenia opłucnej. Wysoka ADA w płynie opłucnowym może potwierdzać proces gruźliczy, podczas gdy niska ADA z wysokim prawdopodobieństwem go wyklucza (8). Podwyższona aktywność nie jest jednak swoista i może występować także w niektórych wysiękach nowotworowych, w ropniaku opłucnej czy reumatoidalnym zapaleniu opłucnej (11). Zdecydowanie wyższą swoistość uzyskuje się zawężając badania do wysięków limfocytarnych (1).

Znane są dwa izoenzymy deaminazy adenozyiny, ADA1 i ADA2, różniące się locus genowym, właściwościami (masą cząsteczkową, optimum pH, względną swoistością substratową, wrażliwością na inhibitory) oraz występowaniem w różnych komórkach. ADA1, izoenzym występujący powszechnie w komórkach, charakteryzuje się zbliżonym powi-

nowactwem do adenozyiny i 2'-deoxyadenozyiny (5). Izoenzym ADA2 ma czterokrotnie niższe powinowactwo do 2'-deoxyadenozyiny niż do adenozyiny oraz nie występuje we wszystkich rodzajach komórek. ADA2 towarzyszy ADA1 w monocytach-makrofagach, z których ten izoenzym jest uwalniany do płynów biologicznych pod wpływem zakażeń mikroorganizmami wewnątrzkomórkowymi (3, 15). Gakis i wsp. (4) oraz Valds i wsp. (13) wykazali, że na wysoką ADA (mierzoną względem adenozyiny) w gruźliczych wysiękach opłucnowych składa się aktywność obu izoenzymów z przewagą ADA2. Autorzy zaproponowali, żeby niski stosunek aktywności względem 2'-deoxyadenozyiny do aktywności względem adenozyiny (poniżej 0,45), wskazujący na większe zaangażowanie ADA2, przyjąć jako kryterium różnicujące wysięki gruźlicze od innych wysięków opłucnowych z wysoką całkowitą ADA mierzoną względem adenozyiny.

W pracy oznaczano całkowitą ADA (względem adenozyiny) i stosunek aktywności względem 2'-deoxyadenozyiny do adenozyiny w gruczolniczych i nowotworowych wysiękach opłucnowych, w celu dokonania własnej oceny wartości diagnostycznej tego parametru.

Metoda i materiał

U wszystkich chorych, u których na podstawie badań obrazowych stwierdzono obecność płynu w jamie opłucnej przeprowadzono wstępne rozróżnienie płynów przebiegowych od wysiękowych na podstawie oceny parametrów fizykochemicznych. W tym celu posłużono się kryteriami Light'a (11). U chorych z płynem wysiękowym wykonano badanie ogólne, cytologiczne i mikrobiologiczne płynu opłucnowego, a w razie potrzeby – igłową biopsję opłucnej i/lub torakoskopię. Inne badania dodatkowe planowano i przeprowadzono w oparciu o dane kliniczne. Należały do nich m.in. badanie mikrobiologiczne płwociny, badanie bronchofiberoskopowe z badaniami mikrobiologicznymi, cytologicznymi i histologicznymi materiałów pozyskanych podczas zabiegu, badania obrazowe dotyczące płuc i opłucnej, sutków, narządów jamy brzusznej i serca. Spośród wysięków o różnej etiologii do badania włączono wysięki o etiologii gruczolniczej i nowotworowej.

Charakterystyka badanych grup chorych

Na podstawie w/w badań rozpoznano etiologię gruczolniczą płynu u 11 chorych, a nowotworową u 15 chorych. Wśród chorych z gruczolniczym wysiękowym zapaleniem opłucnej było 9 mężczyzn i 2 kobiety średniej wieku $49,3 \pm 20,7$ lat (przedział 29-85 lat). U 6 osób stwierdzono wysięk w prawej jamie opłucnej, u 5 – w lewej jamie opłucnej. Potwierdzenie gruczolniczej etiologii wysięku uzyskano u 9 osób na podstawie wyniku badania histologicznego biopsji z opłucnej (obecna ziarnina gruczolniczo-podobna), u 1 osoby stwierdzono obecność *Mycobacterium tuberculosis* w płynie opłucnowym (mikroskopia, posiew,

identyfikacja materiału genetycznego) i u 1 osoby – obecność licznych prątków *M. tuberculosis* w płwocinie (mikroskopia, posiew, identyfikacja materiału genetycznego), przy jednoczesnej obecności limfocytarnego wysięku w opłucnej.

Grupę chorych z nowotworowym, wysiękowym zapaleniem opłucnej stanowiło 15 osób (6 M, 9K), średnia wieku $67,1 \pm 10,0$ lat (przedział 43-83 lat). U 7 osób stwierdzono wysięk w prawej, u 8 osób w lewej jamie opłucnej. U 8 osób potwierdzono obecność ognisk nowotworowych w opłucnej (obecność komórek nowotworowych w płynie – 4 osoby, obecność ognisk nowotworu w biopsjach opłucnej pozyskanych za pomocą biopsji igłowej lub torakoskopowej – 6 osób). U pozostałych 7 osób podstawę do rozpoznania nowotworowej etiologii wysięku stanowił sugestywny obraz kliniczny, wyniki badań obrazowych, potwierdzenie obecności choroby nowotworowej w lokalizacji innej niż jama opłucnej przy jednoczesnym wykluczeniu innej etiologii płynu.

Porównanie niektórych cech fizykochemicznych oraz składu komórkowego wysięków gruczolniczych i nowotworowych przedstawiono w tabeli I.

Oznaczanie ADA

Całkowitą ADA oraz aktywność względem 2'-deoxyadenozyiny oznaczano kolorymetryczną metodą wg Giusti (6). W skrócie, 50 µl płynu (dwie równoległe próby) inkubowano przez 60 min. w 37°C z 1 ml 21 mM adenozyiny (albo 21 mM 2'-deoxyadenozyiny) w 50 mM buforze sodowo-fosforanowym pH 6,5. Uwolniony amoniak był oznaczany w reakcji z 3 ml 106 mM fenolu z 0,17 mM nitroprusykiem sodu w obecności 3 ml alkalizującego roztworu podchlorynu sodu (11 mM NaOCl z 125 mM NaOH) przez 30 min. w 37°C. Ekstynkcję (E) mierzono przy długości fali 628 nm wobec wody destylowanej. W celu wykluczenia amoniaku nie pochodzącego z reakcji deaminacji, równoległe wykonywano trzy próby kontrolne: *próbę odczynnikową*, z buforem fosforanowym zamiast roztworu adenozyiny i wodą destylowaną zamiast płynu, *próbę adenozyinową*, gdzie tylko płyn zastąpiono wodą oraz *próbę ślepą* z buforem fosforanowym zamiast roztworu adenozyiny. Jako *standard* stosowano 1 ml 75 µm siarczany amonowy.

Tabela I. Cechy fizykochemiczne oraz skład komórkowy wysięków gruczolniczych i nowotworowych
Table I. Chemical properties, total and differential cell count in tuberculous and malignant effusions

Badane parametry / Examined parameters	Wysięk / effusion	
	Gruczolniczy / tuberculous	Nowotworowy / malignant
Ciężar właściwy / Specific gravity (g/L)	1022±2,29	1019±3,25
pH	7,32±0,1	7,34±0,15
Stężenie białka w płynie / Pleural fluid protein (g/L)	50,1±7,7	43,3±9,2
Stężenie białka w płynie: stężenie białka w osoczu / Pleural fluid protein : serum protein ratio	0,74±0,1	0,66±0,1
Aktywność LDH w płynie / Pleural fluid LDH (U/L)	1828,1±1411,0	2164,23±2843,76
LDH w płynie: LDH w osoczu / Pleural fluid: serum LDH ratio	2,6±1,66	3,31±4,52
Stężenie glukozy w płynie / Pleural fluid glucose (mg/dL)	69,10±27,12	83,92±42,4
Liczba komórek jądrowych w płynie /mm ³ / Total cell count /mm ³	2592±1473,6	1310±784,32
Makrofagi/monocyty (%)	4,95±2,9	13,42±9,67
Limfocyty / Lymphocytes (%)	88,3±8,13	64,54±20,67
Neutrofile / Neutrophils (%)	4,7±6,55	14,38±8,68
Eosinofile / Eosinophiles (%)	1,9±4,46	2,15±4,44
Komórki międzybłonka (%) / Mesothelial cells (%)	0,15±0,24	2,65±3,33

w miejsce roztworu adenozyny, z wodą zamiast płynu. ADA wyrażaną w jednostkach aktywności na jeden litr {U/L} obliczano zgodnie ze wzorem:

$$\text{Aktywność (37°C)} = \frac{=50\{U/L\} \times [(E_{\text{płyn}} - E_{\text{słupa}}) - (E_{\text{adenozynowa}} - E_{\text{odczynnikowa}})]}{[E_{\text{standard}} - E_{\text{odczynnikowa}}]}$$

gdzie 1U odpowiada uzyskanemu 1 mikromolowi produktu reakcji w czasie 1 min. w standardowych warunkach temperatury i pH.

Ze względu na zaobserwowane hamowanie ADA w nie-rozcieńczonych płynach, wszystkie płyny przed oznaczeniem rozcieńczano ośmiokrotnie 50 mM buforem sodowo-fosforanowym pH 6,5.

Wyniki badań

W serii doświadczeń stwierdzono, że dwu- i czterokrotne rozcieńczanie płynów opłucnowych nie powoduje proporcjonalnego spadku ADA, co ilustruje linia A na rycinie 1, sporządzonej na podstawie wybranego przykładu. W celu sprawdzenia poprawności wykonywanego pomiaru, zmierzono aktywność komercyjnego preparatu deaminazy adenozyny o stężeniu wyjściowym 50 U/L oraz w rozcieńczeniach 1:2 i 1:4. Oznaczona aktywność była proporcjonalna do stopnia rozcieńczenia (ryc. 1. linia B). Dodanie 10 µl 5000 U/L ADA do 1 ml płynu opłucnowego spowodowało, że nie obserwowano proporcjonalnego spadku aktywności wraz z rozcieńczaniem próby, podobnie jak w przypadku samego płynu (ryc. 1, linia C). Opisane zjawisko wskazuje, że w płynie opłucnowym występuje bliżej nieokreślony czynnik hamujący ADA i by

miar był poprawny należy płyn uprzednio rozcieńczyć. (Ryc. 1.)

Dla ustalenia stopnia rozcieńczenia wybrano kilka płynów gruźliczych. Dopiero ośmiokrotne rozcieńczenie płynu powoduje proporcjonalnie dwa razy niższą ADA niż przy rozcieńczeniu czterokrotnym. W dalszych oznaczeniach ADA rozcieńczano płyny opłucnowe buforem sodowo-fosforanowym w stosunku 1:8. (Ryc. 2)

We wszystkich przypadkach chorych na gruźlicę ADA była większa od 40 U/L, wartości, którą wielu autorów uważa za graniczną (2, 5, 9) i wynosiła średnio 85,3±47,1 U/L. Jednocześnie w żadnym z płynów nowotworowych ADA nie przekroczyła wartości 40 U/L, osiągając średnio 10,6±7,7 U/L, co jest różnicą wysoce znaczącą, $p < 0,001$ (Mann-Whitney U-test). (Ryc.3)

W dalszej kolejności oznaczano aktywność enzymu wobec 2'-deoxyadenozyny i wyliczano stosunek aktywności względem obu substratów: 2'-deoxyadenozyna/adenozyna (ryc. 4). W 9/11 płynów gruźliczych stosunek ten był poniżej 0,45. W dwóch przypadkach wynosił jednak około 0,6. W większości płynów nowotworowych (10/15) aktywność z 2'-deoxyadenozyną jako substratem była poniżej czułości, uniemożliwiając wyliczenie współczynnika 2'-deoxyadenozyna/adenozyna. W czterech przypadkach współczynnik był poniżej 0,45, a tylko jeden był większy od 0,45. (Ryc.4)

Ryc. 1 Hamowanie ADA w płynie opłucnowym
Inhibition of ADA in pleural effusion

	rozcieńczenie / dilution		
	1:1	1:2	1:4
Płyn opłucnowy / pleural effusion (A)	26,8	28,2	18,8
ADA (B)	52,4	23,1	9,2
Płyn opłucnowy / pleural effusion +ADA (C)	50,2	49,2	49,1

Ryc. 2 ADA w zależności od stopnia rozcieńczenia płynu opłucnowego
Fig. 2 ADA in relation to dilution of pleural effusion

	rozcieńczenie / dilution			
	1:1	1:2	1:4	1:8
ADA	29,6	38	20,2	11,2

Ryc.3. ADA w wysiękach opłucnowych.
Fig. 3. ADA in pleural effusions

Ryc.4. Stosunek aktywności 2'-deoxyadenozyna/ adenozyne
Fig. 4 2'-deoxyadenozyna/ adenozyne ratio

Omówienie wyników i wnioski

Z metaanalizy przedstawionej przez Goto i wsp. (7) na podstawie 40 artykułów z lat 1966-1999 wynika, że w ocenie przydatności ADA w diagnostyce gruźliczego wysięku w opłucnej, czułość tego parametru waha się od 47,1% do 100%, a swoistość w granicach 50-100%. W przedstawionych badaniach, ADA mierzona w wysiękach opłucnowych względem adenozy po ośmiokrotnym rozcieńczeniu płynu, jest bardzo dobrym parametrem różnicującym wysięki gruźlicze od nowotworowych. Podwyższoną aktywność (powyżej 40 U/L) stwierdzono w każdym płynie gruźliczym (czułość 100%) i jednocześnie w żadnym płynie nowotworowym (swoistość 100%). Rekomendujemy rozcieńczanie płynu przed oznaczeniem ze względu na stwierdzone hamowanie ADA w płynie nierozcieńczonym. Nie jest to unikalne zjawisko, gdyż przykładowo w rutynowym oznaczeniu aktywności konwertazy angiotensyny I (ACE) Lieberman i Sastre (10) zalecają rozcieńczenie badanej surowicy w stosunku 1: 8 z powodu obecności naturalnego inhibitora ACE.

Oznaczanie stosunku aktywności 2'-deoxyadenozyna/adenozy w płynach opłucnowych już nie wygląda tak obiecująco w przedsta-

wionych badaniach. W 2/11 przypadkach gruźlicy współczynnik ten wskazywał, że za podwyższoną całkowitą ADA odpowiedzialna jest obecność obu izoenzymów, ADA1 i ADA2. Takie spostrzeżenie można znaleźć także w publikacjach innych autorów. Dla przykładu, w badaniach Valdes i wsp. (14) w 4/127 przypadkach podwyższonej całkowitej ADA w gruźliczych wysiękach nie towarzyszył wysoki poziom ADA2. W badanych przez nas wysiękach nowotworowych aż w 10/15 przypadkach stosunku tego nie można było oznaczyć, co wynika z faktu, że całkowita ADA była w tej grupie bardzo niska ($10,6 \pm 7,7$ U/L). W dalszych badaniach, dla rozróżnienia aktywności pochodzącej od obu izoenzymów celowe wydaje się zastosowanie erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adeniny (EHNA), specyficznego inhibitora ADA1 (12).

Na podstawie wyników naszych badań można ostrożnie wnioskować, że modyfikacja oznaczenia ADA przez wprowadzenie ośmiokrotnego rozcieńczenia płynu powoduje, że parametr ten dobrze różnicuje gruźlicze i nowotworowe wysięki opłucnowe, bez potrzeby oznaczania aktywności izoenzymów ADA1 i ADA2. Konieczna jest jednak kontynuacja badań większych grup chorych.

Piśmiennictwo

1. Burgess L. J. i wsp.: Combined use of pleural adenosine deaminase with lymphocyte/neutrophil ratio: increased specificity for the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Chest* 1996, 109, 414-419.
2. Castro D. J. i wsp.: Diagnostic value of adenosine deaminase in nontuberculous lymphocytic pleural effusions. *Eur. Respir. J.* 2003, 21, 220-224.
3. Conlon B. A. i Law W. R.: Macrophages are a source of extracellular adenosine deaminase-2 during inflammatory responses. *Clin. Exp. Immunol.* 2004, 138, 14-20.
4. Gakis C. i wsp.: Serum and pleural adenosine deaminase activity: Correct interpretation of the findings. *Chest* 1991, 99, 155-1556.
5. Gakis C.: Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *Eur. Respir. J.* 1996, 9, 632-633.
6. Giusti G.: Adenosine Deaminase. red. Bergmeyer H. U.: *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York 1974, 1092-1099.
7. Goto M. i wsp.: Diagnostic value of adenosine deaminase in tuberculous pleural effusion: a metaanalysis. *Ann. Clin. Biochem.* 2003, 40, 374-381.
8. Laniado-Laborn R.: adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pleural effusion: is it really an ideal test? A word of caution. *Chest* 2005, 127, 417-418.
9. Lee Y. C. G. i wsp.: adenosine deaminase levels in non-tuberculous lymphocytic pleural effusions. *Chest* 2001, 120, 356-361.
10. Lieberman J. i Sastre A.: An angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor in human serum. Increased sensitivity of the serum ACE assay for detecting active sarcoidosis. *Chest* 1986, 90, 869-875.
11. Light R.W. *Pleural Diseases*. Fourth Edition., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001.
12. Muraoka T. i wsp.: Automated enzymatic measurement of adenosine deaminase isoenzyme activities in serum. *Anal. Biochem.* 1990, 187, 268-272.
13. Valds L. i wsp.: Adenosine deaminase (ADA) izoenzyme analysis in pleural effusions: diagnostic role, and relevance to the origin of increased ADA in tuberculous pleurisy. *Eur. Respir. J.* 1996, 9, 747-751.
14. Valds L. i wsp.: Tuberculous Pleurisy: A Study of 254 Patients. *Arch. Intern. Med.* 1998, 158, 2017-2021.
15. Zuckerman S. H., Olson J. M. i Douglas S. D.: Adenosine deaminase activity during in vitro culture of human peripheral blood monocytes and pulmonary alveolar macrophages. *Exp. Cell Res.* 1980, 129, 281-287.