



Akciğer Tüberkülozlu Hastaların Bronkoalveolar Lavajında İL-12, İFN- γ ve sİL-2 Düzeyleri

IL-12, IFN- γ and sIL-2 Levels in Bronchoalveolar Lavage of Patients with Pulmonary Tuberculosis

Murat ACAT¹, Veysel YILMAZ²

¹Karabük Üniversitesi Karabük Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Hastalıkları Kliniği, Karabük, Türkiye
²Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi, İstanbul, Türkiye

Yazışma Adresi
Correspondence Address

Murat ACAT
Karabük Üniversitesi Karabük
Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Göğüs Hastalıkları Kliniği,
Karabük, Türkiye
E-posta: macat79@hotmail.com

Geliş tarihi \ Received : 27.02.2018
Kabul tarihi \ Accepted : 20.04.2018
Elektronik yayın tarihi : 30.04.2018
Online published

Acat M, Yılmaz V. Akciğer tüberkülozlu hastaların bronkoalveolar lavajında İL-12, İFN- γ ve sİL-2 düzeyleri. Akd Tıp D 2019;1:112-115.

Murat ACAT
ORCID ID: 0000-0002-7163-4882
Veysel YILMAZ
ORCID ID: 0000-0001-7396-7616

ÖZ

Amaç: Çalışmamızda lokal immün cevabı yansıttığı düşünülen sitokin seviyelerini (İL-12, İFN- γ ve sİL-2) bronkoalveolar lavaj sıvısında ölçerek balgamda yayma negatif saptanan hastalar ile balgam yayması pozitif olan hastaları karşılaştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntemler: Çalışma retrospektif olarak dizayn edildi. Çalışmaya Ekim 1998-Şubat 1999 arasında Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde tetkik ve tedavi edilen 24 tüberküloz hastası alındı. Kontrol grubu olarak diğer nedenlerle bronkoskopi yapılmış olan akciğer malignitesi veya tüberkülozu olmayan 15 hasta alındı.

Bulgular: Hasta ve kontrol grupları İL-12, İFN- γ ve sİL-2 düzeyleri açısından karşılaştırıldığında İL-12 ve İFN- γ düzeylerinin anlamlı şekilde farklı olduğu tespit edildi (sırasıyla p: 0,02 ve p<0,001).

Sonuç: Tüberküloz hastalarının bronkoalveolar lavaj sıvılarında İFN- γ düzeyinde belirgin artış tespit edilmesi önemli bir bulgudur. Bu İFN- γ artışına İL-12 düzeyi artışının da eşlik etmesi bu iki sitokinin lokal inflamasyon belirteci olarak da kullanılabilirdiğini düşündürmüştür. Bu sitokinlerin tanısal anlamda da kullanılabilirliğini araştıran daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Bronkoalveolar lavaj, İnterferon, İnterlökinler, Tüberküloz

ABSTRACT

Objective: We aimed to compare cytokine levels (IL-12, IFN- γ and IL-2), thought to reflect local immunologic response, in sputum smear positive and negative patients by measuring them in bronchoalveolar lavage fluid in this study.

Material and Methods: The study had a retrospective design. A total of 24 tuberculosis patients who were examined and treated at Yedikule Chest Diseases and Chest Surgery Training and Research Hospital between October 1998 and February 1999 were included. Patients without pulmonary malignancy and tuberculosis who had undergone bronchoscopy for other reasons were included as the control group.

Results: When the IL-12, IFN- γ and sIL-2 levels were compared in the patient and control groups, the IL-12 and IFN- γ levels were found to show a significant difference (p: 0.02 and p <0.001, respectively).

Conclusion: The significant increase in IFN- γ levels in the bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients is an important finding. The increase in IL-12 levels accompanying those of IFN- γ suggests that these two cytokines may also be used as markers for inflammation. There is a need for more extensive studies to investigate the diagnostic utility of these cytokines.

Key Words: Bronchoalveolar lavage, Interferon, Interleukins, Tuberculosis

GİRİŞ ve AMAÇ

Tüberküloz (TB) insanlık tarihinin bilinen en eski hastalıklarından birisidir. Gelişen tanı yöntemlerine rağmen akciğer TB'i olgularında TB basiline mikroskopta görülmesi önemini hala korumaktadır. Özellikle balgamda basilin görülemediği bazı durumlarda kültür sonuçlarının çıkmasına kadar kesin tanı konulamamaktadır. Balgamda basil negatif hasta grubunda erken tanı için arayışlar devam etmektedir.

İL-12 disülfid bağı ile bağlanmış iki subünitten oluşan heterodimerik bir sitokindir (1,2). İL-12 TB basiline lenfositler tarafından tanınmasına katkıda bulunabilir (3). Aynı zamanda İL-12'nin TB basiline karşı oluşan T hücre büyümesi sırasında da büyüme faktörü olarak rol oynadığı da gösterilmiştir (4).

İFN-γ sistemik ve lokal inflamasyon oluşumunda çok önemli role sahip olan bir sitokindir ve tüberkülostatik makrofaj kapasitesini aktive edici özelliğe sahiptir. Çözünebilir İL-2 ekstraselüler alanda bulunan İL-2 formudur ve inflamasyon alanında artmış konsantrasyonlarda bulunabilir (5).

Klinik ve radyolojik olarak TB düşünülen fakat balgamında basil negatif saptanan olgularda kültür sonucunu beklemeden hızlı tanı koyabilmek amacıyla bronkoskopik materyaller de kullanılabilir. Yapılan iki büyük çalışmada balgamda yayma negatif, kültür pozitif bulunan hasta grubunda bronkoskopik yıkantı suyunda %38-44 oranında pozitiflik saptanmıştır (6,7).

Biz bu çalışmamızda lokal immün cevabı yansıttığı düşünülen sitokin seviyelerini (İL-12, İFN-γ ve sİL-2) bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısında ölçerek balgamda yayma negatif saptanan hastalar ile balgam yayması pozitif olan hastaları karşılaştırmayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Hastalar

Çalışma retrospektif olarak dizayn edildi. Çalışmaya Ekim 1998-Şubat 1999 arasında Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde tetkik ve tedavi edilen 24 TB hastası alındı. Kontrol grubu olarak diğer nedenlerle bronkoskopi yapılmış olan akciğer malignitesi veya TB'si olmayan 15 hasta alındı.

Hastalar; klinik ve radyolojik olarak aktif TB düşünülen ve balgamda basil pozitif saptanan hastalar Grup 1, klinik ve radyolojik olarak aktif TB düşünülen ancak en az 3 balgamda basil negatif saptanıp BAL'da yayması veya kültürü pozitif bulunan hastalar Grup 2 ve kontrol grubu hastaları ise Grup 3 olarak ayrıldı.

Grup 1 hastalar servise yatırılır yatırılmaz fiberoptik bronkoskopi ile BAL yapıldı ve hiç vakit kaybedilmeden

İzoniyazid+Rifampisin+Morphazinamid+Etambutol ile antitüberküloz tedavi başlandı. Grup 2 hastalara en geç 5 gün içerisinde fiberoptik bronkoskopi ile BAL yapıldı ve örnekler laboratuvara gönderildi. Grup 3 hastalarının 9'u (%60) nedeni bilinmeyen hemoptizi, 4'ü (%26,7) plöropnömoni ve 2'si (%13,3) bronşiektazi hastasıydı.

Bronkoskopik İşlem

Tüm olgulara lokal %2'lik lidokain anestezisi uygulanarak fleksible bronkoskopi ile (Olympus) BAL yapıldı. radyolojik olarak lezyon tespit edilen veya bronkoskopik olarak şüpheli segmentlere 80-100 ml steril %0,9 NaCl verildi ve sonrasında sıvının kendi basıncı ile çok yavaş olarak geri alındı. Radyolojisi şüpheli olan hemoptizili olgularda bronkoskopi ancak hemoptizi kesildikten 48 saat sonra yapıldı ve bu olguların hiç birinde kanama odağı tespit edilmedi. Alınan tüm BAL sıvıları mukus tabakadan arındırılmak amacıyla iki tabaka steril gazlı bezden geçirildi. Süzülen materyalin bir kısmı (5 cc) yayma-kültür için bakteriyolojiye geri kalan kısmı ise maksimum 45 dakikalık bir sürede buz içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. Laboratuvarında materyaller 10 dakika 1000 devirde santrifüj edildi. Süpernatant ayrıldı ve deneyin yapılacağı zamana kadar -80 C⁰'de donduruldu.

Laboratuvar Testler

İL-12: Standartlar ve numuneler kuyucuklara konuldu, üzerlerine FITC-konjugat reaktifi eklendi. Oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra yıkama solüsyonu ile plak yıkandı. Kuyucuklara HRP-konjugat reaktifi konuldu. Enzimatik renklenme reaksiyonu için 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve stop solüsyonu ile reaksiyon durduruldu. Plak ELİSA okuyucusunda 450-550 nm absorbanısında okutuldu. Endojen, Inc. EH2-İL12T(p40&p70) kiti kullanıldı.

İFN-γ ve sİL-2 düzeyi immünoenzimometrik yöntem ile ve Human Interferon gamma ELİSA EH-IFNG kiti kullanılarak ELİSA aracılığı ile değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde Windows için SPSS V6.1 paket programı kullanıldı. Sayısal verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile kontrol edildi. Gruplar karşılaştırılırken One way ANOVA ve Kruskal-Wallis testleri kullanıldı. Grupların ikili karşılaştırılması için Student's t testi veya Mann-Whitney U testi kullanıldı. p<0,05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Grup 1-2 ve 3'ün medyan yaşları sırasıyla 33, 28 ve 25 yıl olarak hesaplandı (aralık 14-65). Grupların medyan yaşları benzer bulundu (p>0,05). Grup 1 ve Grup 2'de 1'er (%8,3), Grup 3'te ise 2 hasta (%13,3) kadındı. Gruplar cinsiyet dağılımı açısından da birbirine benzer bulundu (p>0,05).

Gruplar İL-12, İFN- γ ve sİL-2 düzeyleri açısından karşılaştırıldığında İL-12 ve İFN- γ düzeylerinin istatistiksel açıdan anlamlı şekilde farklı olduğu tespit edildi (sırasıyla p: 0,02 ve p<0,001). Grupların sİL-2 düzeyleri arasında fark bulunamadı (p>0,05). Tablo I grupların İL-12, İFN- γ ve sİL-2 seviyelerini göstermektedir.

İL-12 ve İFN- γ için yapılan post-hoc analizlerde istatistiksel farkın İL-12 ve İFN- γ için Grup I'den kaynaklandığı tespit edildi. Tablo II Grupların ikili karşılaştırma sonuçlarını göstermektedir.

Grup 1 hastalarda İFN- γ düzeyleri ile İL-12 seviyeleri arasında pozitif ve istatistiksel açıdan anlamlı bir korelasyon tespit edildi (p<0,001 ve r=0,930).

TARTIŞMA

Tüberküloz basiline karşı konağın geliştirdiği hücrel immün yanıtta İFN- γ 'nın önemli rol oynadığı gösterilmiş ve İFN- γ 'nın mikobakteriye karşı hücrel cevabın önemli bir belirteci olabileceği öne sürülmüştür. İFN- γ ve İFN- γ reseptörü olmayan farelerin BCG ile enfeksiyona aşırı derecede duyarlı oldukları görülmüş ancak bu duyarlılığın mekanizması net olarak ortaya konulamamıştır (8,9). Robinson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada TB olgularında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında alveolar makrofajlarda artmış İFN- γ mRNA ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir ve İFN- γ 'nın lokal immün cevabı yansıttığını düşünmüşlerdir (10).

Condos ve ark. yaptıkları çalışmada 30 TB olgusunda lezyonun olduğu lokalizasyondan yapılan BAL sıvısında İFN- γ düzeyinin arttığını göstermişlerdir (11). Taha ve ark. da aktif ve inaktif TB olgularında yaptıkları bir çalışmada İFN- γ mRNA ekspresyon eden BAL hücrelerinin aktif TB hastalarında daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir ve bu bulgunun hastalık aktivitesi ile ilişkilendirilebileceği sonucuna ulaşmışlardır (12). Liu ve ark. da yakın zamanda yaptıkları çalışmada yaş, pulmoner kavite varlığı ve İFN-

γ düzeylerinin birlikte ele alındığında balgam negatif ve balgam çıkaramayan TB olgularında mikobakteri pozitifliğini tahmin etmek için kullanılabileceğini göstermişlerdir (13). Öte yandan Küpeli ve arkadaşları balgam negatif hastalarda BAL sıvısında tanısal olabilecek parametreleri araştırdıkları çalışmada İL-2 ve İFN- γ düzeylerinin TB tanısı için kullanılmayacağı sonucuna ulaşılmıştır (14). Literatürde BAL sıvısında İL-2 ve İFN- γ düzeyleri ile TB tanısı konulabilmesi ile ilgili veriler çelişkilidir.

Bizim çalışmamızda da balgamda ARB tespit edilen grubun kontrol grubu ve balgam negatif hasta grubuna göre İFN- γ düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu bulgular İFN- γ 'nın TB'nin immünopatogenezinde ve enfeksiyon sürecinin belirlenmesinde önemli bir belirteç olabileceğini desteklemektedir.

Son yıllarda TB immünopatogenezinin yönelik yapılan çalışmalarda TB'de Th1 yönündeki immünolojik cevabın İFN- γ ve İL-12 aracılı olduğu öne sürülmüştür (10-12). TB'e karşı gelişen hücrel immünitede İL-12'nin kritik rolü olduğu düşünülmektedir. TB'de BAL sıvısında İL-12 ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur ve aktif TB olgularında yüksek İL-12 seviyeleri bulunmuştur (12,15). Nolan ve ark.'nın 2013 yılında yaptıkları çalışmada İL-12 düzeyi balgamda basil saptanan TB hastalarında balgam negatif hastalara göre belirgin yüksek bulunmuştur (16). Çalışmamızın sonuçları da bu anlamda benzer bilgiler ortaya koymaktadır. Bizim çalışmamızda da balgamda ARB tespit edilen hastalarda kontrol grubu ve balgam negatif hastalara göre BAL sıvısında daha yüksek İL-12 seviyeleri saptanmıştır. Aynı zamanda çalışmamızda aktif TB'li hastaların BAL sıvısında İFN- γ ile İL-12'nin pozitif korelasyon göstermesi bu iki sitokinin TB'e karşı gelişen immün yanıtta yakın etkileşim halinde olduğunu bir göstergesidir.

Tablo I: Hastaların İL-12, İFN- γ ve sİL-2 seviyeleri.

| | Grup 1 | Grup 2 | Grup 3 | P |
|---------------|------------|------------|------------|------------------|
| İL-12 | 38,73±15,2 | 10,15±13,3 | 10,81±7,9 | 0,02 |
| İFN- γ | 142,09±159 | 17,74±11,4 | 9,75±5,8 | <0,001 |
| sİL-2 | 27,51±15,2 | 29,56±12,2 | 35,06±14,8 | >0,05 |

Tablo II: Grupların ikili karşılaştırma sonuçları.

| | İL-12 | İFN- γ | sİL-2 |
|---------------|------------------|-----------------|------------------|
| Grup 1-Grup 2 | p=0,02 | p=0,0009 | p>0,05 |
| Grup 1-Grup 3 | p=0,03 | p=0,0001 | p>0,05 |
| Grup 2-Grup 3 | p>0,05 | p=0,06 | p>0,05 |

TB'de BAL sıvısında İL-2 düzeyleri ile ilgili literatürde çeşitli sonuçlar mevcuttur. Bazı yazarlar İL-2 düzeylerini TB hastalarının BAL sıvısında artmış bulurken, bazıları kontrol grubuna göre bir artış saptamamışlardır (12,17-19). Bizim çalışmamızda da sİL-2 düzeyleri TB hastaları ve kontrol grubu arasında benzer bulunmuştur.

Sonuç olarak çalışmamızın bazı kısıtlılıkları olsa da TB hastalarının BAL sıvılarında İFN-γ düzeyinde belirgin artış tespit edilmesi önemli bir bulgudur. Bu İFN-γ artışına İL-12 düzeyi artışının da eşlik etmesi bu iki sitokinin lokal inflamasyon belirteci olarak da kullanılabilirliğini düşündürmüştür. Bu sitokinlerin tanınan anlamda da kullanılabilirliğini araştıran daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Wolf SF, Temple Pa, Kobayashi M, Young D, Diczig M, Lowe L, Dzialo R, Fitz L, Ferenz C, Hewick RM. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol* 1991; 146(9):3074-81.
2. Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, Dwyer CM, McComas W, Motyka R, Nabavi N, Wolitzky AG, Quinn PM, Familletti PC. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88(10):4143-7.
3. Boom WH, Toossi Z, Wolf SF. The modulation by IL-2, NKSf (IL-12/CLMF) and TGF-β CD4+ T cell mediated cytotoxicity for macrophages (abstract). In *Proc Twenty-Seventh Joint Conf Tuberc Lepr* 1992;163-7.
4. Zhang M, Gately MK, Wang E, Gong J, Wolf SF, Lu S, Modlin RL, Barnes PF. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest* 1994; 93(4):1733-9.
5. Nikaido T, Shimizu N, Ishida N, Sabe H, Teshigawara K, Maeda M, Uchiyama T, Yodoi J, Honjo T. Molecular cloning of cDNA encoding human IL-2 receptor. *Nature* 1984; 311:631-5.
6. Panek SJ, Boer JS. Diagnosis of pulmonary tuberculosis by flexible fiberoptic bronchoscopy. *Am Rev Respir Dis* 1979; 119:677-9.
7. Chan HS, Sun AJ, Hoheisel GB. Bronchoscopic aspiration and Bronchoalveolar lavage in diagnosis of sputum smear-negative pulmonary tuberculosis. *Lung* 1990; 168:215-20.
8. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defect of immune cell function in mice with disrupted γ-interferon genes. *Science* 1993; 259:1739-42.
9. Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek J, Zinkernagel RM, Aguet M. Immune response in mice that lack the interferon-γ receptor. *Science* 1993; 259:1742-5.
10. Robinson DS, Ying S, Taylor IK, Wangoo A, Mitchell DM, Kay AB, Hamid Q, Shaw RJ. Evidence for a Th1-like bronchoalveolar T-cell subset and predominance of interferon-gamma gene activation in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:989-93.
11. Condos R, Rom WN, Liu YM, Schluger NW. Local immune responses correlate with presentation and outcome in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:729-35.
12. Taha RA, Kotsimbos TC, Song YL, Menzies D, Hamid Q. IFN-gamma and IL-12 are increased in active compared with inactive tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1135-9.
13. Liu X, Hou X-F, Gao L, Deng GF, Zhang MX, Deng QY, Ye TS, Yang QT, Zhou BP, Wen ZH, Liu HY, Kornfeld H, Chen XC. Indicators for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* positivity detected with bronchoalveolar lavage fluid. *Infectious Diseases of Poverty* 2018; 7:22.
14. Küpeli E, Karnak D, Beder S, Kayacan O, Tutkak H. Diagnostic accuracy of cytokine levels (TNF-alpha, IL-2 and IFN-gamma) in bronchoalveolar lavage fluid of smear-negative pulmonary tuberculosis patients. *Respiration* 2008; 75(1):73-8. Epub 2007 Nov 1.
15. Taha RA, Minshall EM, Olivenstein R, Ihaku D, Wallaert B, Tscopoulos A, Tonnel AB, Damia R, Menzies D, Hamid QA. Increased expression of IL-12 receptor mRNA in active pulmonary tuberculosis and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1119-23.
16. Nolan A, Fajardo E, Huie ML, Condos R, Pooran A, Dawson R, Dheda K, Bateman E, Rom WN, Weiden MD. Increased Production of IL-4 and IL-12p40 from bronchoalveolar lavage cells are biomarkers of *Mycobacterium tuberculosis* in the Sputum. *PLoS ONE* 2013; 8(3):e59461.
17. Somoskovi A, Zissel G, Zipfel PF, Ziegenhagen MW, Klauke J, Haas H, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Different cytokine patterns correlate with the extension of disease in pulmonary tuberculosis. *Eur Cytokine Netw* 1999; 10:135-42.
18. Pushpakom R, Ong-Ajyooth S, Bovornkitti S. The association of adenosine deaminase activity with T-lymphocytes and subsets in pulmonary tuberculosis and bronchogenic carcinoma. *J Med Assoc Thai* 1990; 73:1-11.
19. Tchou-Wong KM, Tanabe O, Chi C, Yie TA, Rom WN. Activation of NK-kappaB in *Mycobacterium tuberculosis*-induced interleukin-2receptor expression in mononuclear phagocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1323-9.