

## Seröz vücut sıvılarının akım sitometri ile incelenmesi: Tek merkez deneyimi

## Investigation of serous body fluids with flow cytometry: single center experience

Ozan SALİM, Utku ILTAR, Orhan Kemal YÜCEL, Ramazan ERDEM, Melike ULUBAŞI, Bahar AKKAYA<sup>2</sup>, Levent ÜNDAR

<sup>1</sup>Akdeniz Üniversitesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı

<sup>2</sup>Akdeniz Üniversitesi, Patoloji Anabilim Dalı

**Yazışma Adresi:** : Ozan Salim Adres: Akdeniz University, School of Medicine, Department of Hematology, Antalya, Turkey. Tel: +90 242 249 67 34 E-mail: ozansalim@gmail.com

**Geliş tarihi / Received:** 03.09.2015

**Kabul tarihi / Accepted:** 29.02.2016

## Öz

**Giriş:** Güncel pratikte seröz vücut sıvıları biyokimyasal, mikrobiyolojik ve sitomorfolojik incelemeler ile değerlendirilmektedir. Seröz vücut sıvıları infeksiyöz ve inflamatuvar hastalıkların yanı sıra hematopoetik ve solid neoplastik hastalıklar sonucu da oluşabilmektedir. Hematopoetik hücrelerin immüfenotipik olarak hızlı değerlendirilmesinde kullanılan akım sitometri yöntemi, özellikle nedeni bilinmeyen seröz vücut sıvılarının irdelenmesinde alternatif bir tanı yöntemidir. Bu çalışmada 4 yıllık süreçte, seröz vücut sıvılarının irdelenmesinde akım sitometri deneyimimizi gözden geçirdik.

**Materyal ve Metod:** Mayıs 2010 - Şubat 2014 tarihleri arasında hastanemiz özel hematoloji bölümü laboratuvarında altı-renkli akım sitometri cihazı ile analizi yapılmış olan 77 hastanın (40 kadın, 37 erkek, ortanca yaş: 56 (20-84)), 80 seröz vücut sıvı örneği (45 plevra, 35 periton) retrospektif olarak incelendi.

**Bulgular:** Kırkbeş plevra sıvı örneğinden 5'inde, 35 periton sıvı örneğinden ise 4'ünde hematolojik neoplazi için tanısal immüfenotipik bulgular gözlemlendi. Bu olgularda tanı ve alt tip tayini doku biyopsisi ve/veya sitomorfolojik analiz ile doğrulandı.

**Tartışma:** Özellikle agresif seyreden ve zamanın hayati değer taşıdığı hematolojik kanserlerde patolojik değerlendirme nispeten uzun sürebilmekteyken akım sitometri ile seröz vücut sıvılarının immüfenotipik analizi daha erken tanıya ulaşmayı sağlayabilir kanısındayız.

**Anahtar kelimeler:** Efüzyon, İmmüfenotipleme, Lenfoma.

## Abstract

**Introduction:** In current clinical practice serous effusions are evaluated by cytomorphological, biochemical and microbiological studies. As well as infections and inflammatory diseases, serous body fluids can also be observed in hematopoietic and solid neoplastic diseases. Flow cytometry (FC) which can be used for evaluation of hematopoietic cells rapidly is an alternative diagnostic tool to examine unexplained serous body effusions. In this study, we reviewed our experience of flow cytometry for evaluating the serous body fluids during 4 years period.

**Materials and Methods:** From May 2010 to February 2014, a total of 80 consecutive serous effusion

specimens (45 pleural, 35 peritoneal) of 77 cases (40 female, 37 male, median age: 56 (20-84)), that were analysed by the six-color FC in the division of hematology laboratory at Akdeniz University Hospital, were investigated retrospectively.

**Results:** Five of 45 pleural fluid samples and 4 of 35 peritoneal fluid samples were observed diagnostic immunphenotypic findings for hematologic neoplasia. Diagnosis was verified by tissue biopsy and/or cytomorphological analysis in these cases.

**Discussion:** Cytopathologic evaluation may be delay especially in the diagnosis of aggressive lymphomas which requires urgent evaluation and treatment. In this case, immunphenotypic analysis of serous body fluids by FC can provide to access early diagnosis and also accurate clinical staging.

**Key Words:** Effusion, Immunophenotyping, Lymphoma

### Giriş

Vücut boşluklarında sıvı birikimi selim (örn. konjestif kalp yetmezliği, hipoproteinemi) ve inflamatuvar (örn. enfeksiyon, bağ doku hastalıkları) hastalıkların yanı sıra malin hastalıklar sonucu da oluşabilmektedir. Malin karakterdeki efüzyonlar en sık akciğer, meme ve over kanserlerinde izlenirken, örneğin plevral efüzyonların %10-15 'ini lenfomalar oluşturmaktadır (1). Lösemi/lenfoma tanılı hastalarda gerek tanı sırasında gerekse de takip sürecinde seröz vücut sıvılarının ortalama % 6-48 oranında görüldüğü bildirilmiştir (2-5). Seröz efüzyon, hematolojik maliniteler içerisinde lenfoproliferatif hastalıklarda daha sık gözlenmektedir. T hücreli lenfomalarda seröz efüzyon görülme oranı B hücreli lenfomalara göre daha fazladır (6-8). Özellikle tanı sırasında efüzyonlar agresif seyirli lenfomalarda (lenfoblastik lenfoma, Burkitt lenfoma (BL), anaplastik büyük hücreli lenfomalar, diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL)) yavaş seyirli lenfomalara göre daha sık izlenmektedir (9-12). Seröz vücut sıvılarının değerlendirilmesinde biyokimyasal, mikrobiyolojik ve sitomorfolojik incelemelerin birlikte değerlendirilmesi standart yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Hücresel eleman içeren sıvıların tanısında

immünhistokimyasal değerlendirme ve sitomorfoloji çoğu olguda tanı için yeterlidir. Ancak özellikle lenfoproliferatif hastalık ön tanısı olan olgularda ek olarak, daha hızlı sonuç veren ve güncel hematolojik uygulamalarda kullanımı giderek artan akım sitometri yöntemi de kullanılabilir. Akım sitometri çalışmaları için periferik kan örneği, kemik iliği aspirasyon materyali, ince iğne aspirasyon materyalleri yanında tüm vücut sıvılarındaki hücreler (torasentez, bronkoalveolar lavaj, parasentez, lomber ponksiyon, vb. ile alınan örnekler) de kullanılabilir. Bu yöntem ile hematopoetik hücrelerin immünfenotiplemesi sonucunda anormal hücreler tanımlanmakta, reaktif lenfosit artışı ile hematolojik malinitelerin ayırıcı tanısı hızlı ve doğru olarak yapılabilmektedir. Bu çalışmada, hematoloji konsültasyonu sonucunda, seröz efüzyonların irdelenmesinde kullanılan akım sitometri yöntemini ve bu konudaki deneyimimizi gözden geçirdik.

### Materyal ve Metod

Mayıs 2010 - Ekim 2014 tarihleri arasında hastanemiz özel hematoloji bölümü laboratuvarında hematoloji konsültasyonu sonucunda akım sitometri incelemesi yapılmış olan 77 hastanın 80 seröz vücut sıvı örneği (plevra ve periton sıvıları) retrospektif olarak incelendi. Elektronik dosya sistemi ve hastane arşivi kullanılarak hastaların yaş, cinsiyet, sıvının alındığı vücut boşluğu, sıvının incelendiği akım

sitometri immünfenotipleme sonucu (selim ya da malin), sıvının değerlendirildiği sitopatoloji raporu ve doku biyopsi patoloji raporları incelendi. 40 kadın ve 37 erkek hastada ortalama yaş 56 (yaş aralığı 20-84) idi. Seröz efüzyon örneklerinde altı renkli akım sitometri yöntemi ile immünfenotipik inceleme, Facs Canto II FlowSitometri cihazı (Becton Dickinson Biosystems, San Jose, USA) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre yapıldı. CD45, CD5, CD19, CD23, CD20, CD11c, CD8, CD3, CD4, CD56, CD103, CD25 ve CD10 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA) monoklonal antikoları kullanılarak paneller oluşturuldu. Örneklerdeki hücre sayısı  $<1 \times 10^6$  olarak ayarlandı. Veriler "Facs Diva Software" kullanılarak analiz edildi (Becton Dickinson Biosystems, San Jose, USA).

### **Bulgular:**

80 sıvı örneğinin 45'ini plevra sıvısı, 35'ini ise periton sıvısı oluşturmaktaydı.

#### **Plevral sıvı:**

45 plevral sıvı örneğinden 5 tanesinde hematolojik malinite için tanısal immünfenotipik bulgular gözlemlendi (DBBHL (2 olgu), NK hücreli lösemi/lenfoma (1 olgu), BL (1 olgu), periferik T hücreli lenfoma (1 olgu)).

#### **Peritoneal sıvı:**

35 periton sıvı örneğinden ise 4 tanesinde hematolojik malinite için tanısal immünfenotipik bulgular gözlemlendi (BL (2 olgu), T hücreli prolenfositik lösemi (1 olgu), non-Hodgkin lenfoma(NHL) (sınıflandırılmayan tip) (1 olgu)). Seröz vücut sıvılarının akım sitometri yöntemi ile hızlı bir şekilde incelenerek malin lenfoid hücrelerin varlığının gösterildiği ve lenfoproliferatif hastalık tanısını kuvvetlendiren 9 olgunun dağılımı Tablo1 de sunulmuştur. Geriye kalan örneklerde ise hematolojik maliniteyi düşündürecek bulguya rastlanmadı. 9 olgu

içerisinde 2 olguda sitopatolojik inceleme yapılmadığı, sitopatolojik inceleme yapılan 7 olgunun ise 4 tanesinin sadece malin sıvı olarak raporlandığı ve malinite alttıpi ile ilgili ek bilgi vermediği görüldü. Geri kalan 3 olgunun sitopatolojik incelemesi ise hematolojik malinite ve/veya diğer malinite tanısı açısından negatif olduğu saptandı. Akım sitometri yöntemi ile tanı alan 9 olgunun tamamında tanı doku biyopsisi ile doğrulandı. Diğer taraftan akım sitometri ile anormal hücre popülasyonu saptanmayan örneklerin sitopatolojik incelemesinin ise sadece bir olgunun malin, 2 olgunun ise atipik hücreler olarak raporlandığı görüldü. Bu 3 olgunun kayıtları incelendiğinde malin sıvı olarak raporlanan olgunun doku biyopsisi ile solid organ malinite tanısı aldığı, diğer 2 olgunun ise hematolojik veya solid organ malinite tanısı almadığı saptandı.

### **Tartışma**

Çalışmamızda nedeni bilinmeyen seröz sıvıların incelenmesinde, sitopatolojik ve doku biyopsisi henüz sonuçlanmadan, hızlı bir tanı aracı olan akım sitometri yöntemi ile yaklaşık %10 oranında hematolojik neoplazi için tanısal immünfenotipik bulgular saptanmıştır. Rutin sitopatoloji pratiğinde seröz efüzyon örneklerinin incelenerek doğru ve kesin tanıya ulaşma konusundaki zorluk devam etmektedir. Özellikle lenfoma ilişkili malin sıvılar değerlendirilirken sitopatolojik incelemeye ilave olarak immünsitokimya, akım sitometri, morfolometri, sitogenetik/moleküler yöntemler (konvansiyonel sitogenetik, "fluorescence in situ hybridisation", polimeraz zincir reaksiyonu, vb.) gibi yardımcı teknikler bu zorluğu aşma konusunda birer seçenek olarak kullanılabilir (13). Bu yöntemlerden bir tanesi olan akım sitometrik inceleme, günümüzde hemen hemen her türlü solid doku örneğinin (süspansiyon haline getirilerek) ve vücut sıvısının çalışılabilirdiği

oldukça faydalı bir yöntemdir. Bu yöntem farklı hücre popülasyonlarının büyüklüklerine, sitoplazmik özelliklerine ve antijen ekspresyon özelliklerine göre hızlı bir biçimde analizini sağlar (14). Akım sitometri yönteminde diğer yöntemlere kıyasla çok az miktarda örnek işlemler için yeterli olabilmektedir.

Johnston ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada NHL tanılı hastaların sıvı örneklerinin önemli bir kısmının lenfomatöz efüzyon açısından pozitif olduğu açık bir şekilde gösterilirken, aynı çalışmada non-hemapoetik maliniteler ve selim durumlarda sıvı içerisinde reaktif lenfositlerin baskın olduğu belirtilmiştir (15). Tek başına sitomorfoloji temel alınarak yapılan incelemede reaktif lenfositler ile düşük dereceli lenfoma ayırımını yapmak oldukça zor olabilmektedir (16). Benzer şekilde örneklerdeki hücre sayısının yetersiz olması veya örnek içerisinde malin ve selim lenfoid hücrelerin karışık halde bir arada bulunması tanıyı zorlaştırabilmektedir. Bu durumlarda akım sitometri yöntemi ile lenfoid hücrelerin immünofenotiplemesi klonal lenfoid popülasyonun belirlenmesini sağlayarak malin efüzyon tanısının doğrulanmasında tek yol olarak karşımıza çıkabilir (17).

Valdes ve arkadaşları 642 plevral sıvı örneğinin %22,9'unda malin hücre gözlemlemişler ve bunların %10,8'inin lenfomaya bağlı olduğunu saptamışlardır (18). Malik ve arkadaşları sitolojik olarak kanıtlanmış 45 malin asit olgusunun %11'inde NHL tespit etmişlerdir (19). Czader ve Ali'nin çalışmasında çoğunluğu lenfoma öyküsü olan hastalardan gönderilen 115 ardışık örnekten 32 tanesinde lenfoma infiltrasyonu saptanmıştır (17). Gordon H. Yu ve arkadaşlarının çalışmasında akım sitometri yöntemi ile 102 plevral sıvı örneğinin 39'unda hematolojik malinite saptanmıştır. Bu olguların 32 tanesinde lenfoma/lösemi hikayesi olduğu, 7 olgunun ise

yeni tanı lenfoma/lösemi tanısı (2 olgu T hücreli lenfoblastik lenfoma, 1 olgu primer efüzyon lenfoma, 1 olgu mantle hücreli lenfoma, 1 olgu DBBHL, 1 olgu marjinal zon lenfoma, 1 olgu plazma hücreli neoplazi) aldığı belirtilmiştir (20). Bu 2 çalışmada etyoloji açısından literatüre göre daha yüksek oranda lenfoma çıkmış olmasının nedeni örnek gönderilen olguların çoğunluğunun hematolojik malinite hikayesine sahip olması olabilir. Bizim çalışmamızda 80 örneğin 9 tanesinde hematolojik malinite tespit edilirken, bu olguların tamamının yeni tanı olduğunu saptadık. Çalışmamızda literatürden farklı olarak hematolojik malinite dışında malin sıvı saptanmamasının nedeni çalışmaya dahil edilen olguların hematoloji konsültasyonu sonrası akım sitometri ile analizi yapılmış olgular olması ve/veya çalışmamıza dahil edilen olgularda patolojiye gönderilen örneklerin değil öncelikli olarak akım sitometri laboratuvarına gönderilen örneklerin geriye dönük incelenmesi olabileceğini düşünüyoruz.

Cesana ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yayınlanan 92 vücut sıvı örneğini içeren çalışmada akım sitometri yönteminin sitomorfolojiye göre daha duyarlı bir yöntem olduğu gösterilmiştir (21). Cezader ve Ali'nin çalışmasında 115 örnek içerisinde başlangıç sitopatolojik değerlendirme ile 54 örnek selim, 18 örnek atipik/şüpheli, 43 örnek de malin olarak raporlanmış, akım sitometri yöntemi de dahil edilerek bu örnekler tekrar değerlendirildiğinde 8 örnek atipik/şüpheli kategorisinden selim kategoriye, 10 örneğin de ( 1 kronik lenfositik lösemi, 2 mantle hücreli lenfoma, 3 foliküler lenfoma, 1 DBBHL, 1 multiple myelom, 1 NK hücreli lösemi, 1anjio-immunoblastik lenfoma) selim ve atipik/şüpheli kategorisinden malin kategoriye geçiş yaptığı görülmüştür (17). Yine Bangarter ve arkadaşlarının çalışmasında

konvansiyonel sitopatoloji ile akım sitometri yöntemi kombine olarak kullanıldığı zaman %100 duyarlılık ve özgüllük ile tanıya ulaşma başarısına sahip olunabileceği belirtilmiştir (22). Bu çalışmalardan da anlaşılacağı üzere özellikle lenfoproliferatif hastalıklarda klasik sitopatoloji ile birlikte akım sitometri yönteminin bir arada kullanılmasının doğru tanıya ulaşma konusunda ve immünofenotipik özelliklere göre alt-tip belirlenmesinde vazgeçilmez bir yol olduğunu düşünüyoruz.

Sonuç olarak, lenfoproliferatif hastalıkların tanısı için çoğunlukla uygun bir lenf nodunun eksizyonel biyopsisi ve patolojik değerlendirme

gerekmektedir. Ancak bu işlem periferik yerleşimli lenf nodu için kolay olmakla birlikte, daha merkezi yerleşimli lenf nodları olan, agresif seyirli hastalığı olan, hızla tedavinin başlanması gereken, efüzyonların eşlik ettiği solunum yetmezliği tablosunda olan hasta grupları için genel anestezi altında mümkün olmayabilmektedir. Eşlik eden seröz efüzyonların varlığı bu noktada immünofenotipik ve sitolojik olarak kolay ve hızlı tanısal değerlendirmeye olanak sağlayabilir. Bu yöntem seçilmiş olgularda birkaç saat içerisinde tanıya ulaşılabilmeyi sağlayarak, hastanın tedavisinde hayati bir rol oynayabilir.

**Tablo I. Efüzyon etyolojisi lenfoproliferatif hastalık saptanan olguların klinik özellikleri**

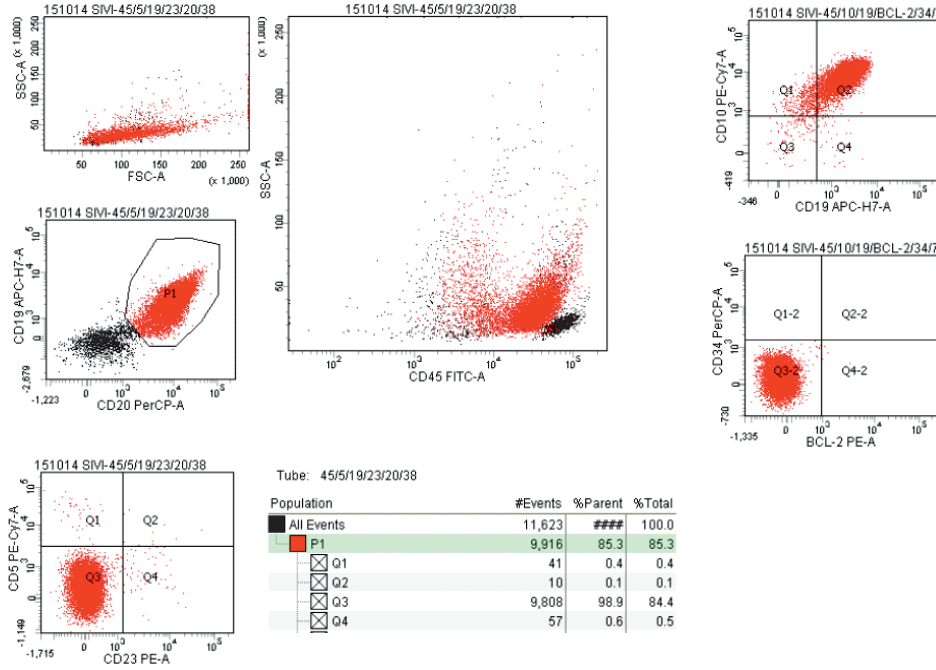
Olgu no	Yaş	Cinsiyet	Sıvı kaynağı	Tanı
1	23	Erkek	periton	BL (Resim 1)
2	35	Erkek	periton	NHL (sınıflandırılmayan)
3	49	Erkek	periton	BL
4	82	Kadın	plevra	DBBHL
5	71	Kadın	plevra	DBBHL
6	33	Erkek	plevra	BL
7	24	Erkek	plevra	NK hücreli lösemi/lenfoma (Resim 2)
8	75	Erkek	periton	T hücreli prolenfositik lösemi
9	75	Kadın	plevra	Periferik T hücreli lenfoma

non-Hodgkin lenfoma, (NHL)

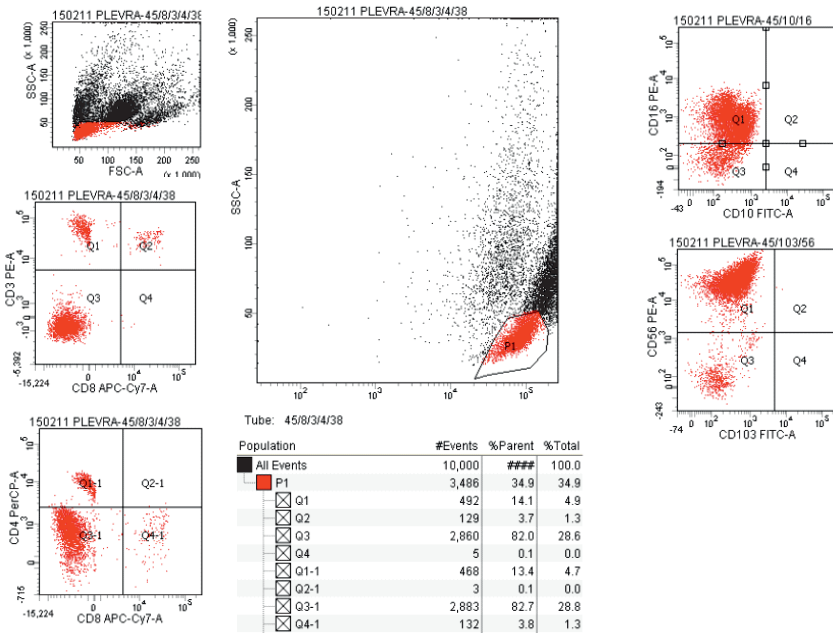
Burkitt lenfoma, (BL)

diffüz büyük B hücreli lenfoma, (DBBHL)

Resim 1. Burkitt lenfoma tanılı olgu 1' in periton sıvısı immunfenotiplemesi



Resim 2. NK hücreli lösemi/lenfomatanlı olgu 7' nin periton sıvısı immunfenotiplemesi



**Kaynaklar:**

- 1-Johnston WW. The malignant pleural effusion. A review of cytopathologic diagnoses of 584 specimens from 472 consecutive patients. *Cancer*. 1985;56:905-909.
- 2-Weick JK, Kieley JM, Harrison EG, Jr., Carr DT, Scanlon PW. Pleural effusion in lymphoma. *Cancer* 1973;31:848-853.
- 3-Berkman N, Breuer R, Kramer MR, Polliack A. Pulmonary involvement in lymphoma. *LeukLymphoma* 1996;20:229-237.
- 4-Essadki O, edWady N, el Abassi Skalli A, et al. Radiological features of thoracic localizations of lymphomas. *Bull Cancer* 1996;83:929-936.
- 5-Das DK, Gupta SK, Ayyagari S, Bambery PK, Datta BN, Datta V. Pleural effusions in non-Hodgkin's lymphoma. A cytomorphologic, cytochemical and immunologic study. *Acta Cytol* 1987;31:119-124.
- 6-Okada F, Ando Y, Kondo Y, Matsumoto S, Maeda T, Mori H. Thoracic CT findings of adult T-cell leukemia or lymphoma. *AJR Am J Roentgenol* 2004;182:761-767.
- 7-Uchiyama K, Kobayashi Y, Tanaka R, et al. Primary malignant lymphoma of the central nervous system presenting with ascites and pleural effusion. *Hematologica (Budap)* 2000;30:143-148.
- 8-Watanabe N, Sugimoto N, Matsushita A, et al. Association of intestinal lymphoma and ulcerative colitis. *InternMed* 2003;42:1183-1187.
- 9-Das DK, Gupta SK, Datta U, Sharma SC, Datta BN. Malignant lymphoma of convoluted lymphocytes: diagnosis by fine needle aspiration cytology and cytochemistry. *Diagn Cytopathol* 1986;2:307-311.
- 10- Chaignaud BE, Bonsack TA, Kozakeiwich HP, Samburger RC. Pleural effusions in lymphoblastic lymphoma: a diagnostic alternative. *J Pediatr Surg* 1998;33:1355-1357.
- 11- Haddad MG, Silverman JF, Joshi VV, Geisinger KR. Effusion cytology in Burkitt's lymphoma. *Diagn Cytopathol* 1995;12:3-7.
- 12- Markovic O, Marisavljevic D, Cemerikic V. Burkitt-like lymphoma: subileus and ascites as the main clinical manifestations. *Srp Arh Celok Lek* 2003;131:458-460.
- 13- Das DK. Serous effusions in malignant lymphomas: a review. *Diagn Cytopathol*. 2006 May;34(5):335-47. Review.
- 14- Shen H, Tang Y, Xu X, Wang L, Wang Q, Xu W, Song H, Zhao Z, Wang J. Rapid detection of neoplastic cells in serous cavity effusions in children with flow cytometry immunophenotyping. *Leuk Lymphoma*. 2012 Aug;53(8):1509-14. doi: 10.3109/10428194.2012.661050. Epub 2012 Mar 1.
- 15- Johnson EJ, Scott CS, Parapia LA, Stark AN. Diagnostic differentiation between reactive and malignant lymphoid cells in serous effusions. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987;23:245-250.
- 16- Santos GC, Longatto-Filho A, de Carvalho LV, Neves JI, Alves AC. Immunocytochemical study of malignant lymphoma in serous effusions. *Acta Cytol* 2000;44:539-542.
- 17- Czader M, Ali SZ. Flow cytometry as an adjunct to cytomorphologic analysis of serous effusions. *Diagn Cytopathol*. 2003 Aug;29(2):74-8.
- 18- Valdes L, Alvarez D, Valle JM, Posse A, San Jose E. The etiology of pleural effusions in an area with high incidence of tuberculosis. *Chest* 1996;109:158-162.
- 19- Malik I, Abubakar S, Rizwana I, Alam F, Rizvi J, Khan A. Clinical features and management of malignant ascites. *J Pak Med Assoc* 1991;41:38-40.
- 20- Yu GH, Vergara N, Moore EM, King RL. Use of flow cytometry in the diagnosis of lymphoproliferative disorders in fluid specimens. *Diagn Cytopathol*. 2014 Aug;42(8):664-70. doi: 10.1002/dc.23106. Epub 2014 Feb 19.
- 21- Cesana C, Klersy C, Scarpati B, Brando B, Volpato E, Bertani G, Faleri M, Nosari A, Cantoni S, Ferri U, Scampini L, Barba C, Lando G, Morra E, Cairoli R. *Leuk Res*. 2010 Aug;34(8):1027-34. doi: 10.1016/j.leukres.2010.02.008. Epub 2010 Mar 5.
- 22- Bangerter M, Hildebrand A, Griesshammer M. Combined cytomorphologic and immunophenotypic analysis in the diagnostic workup of lymphomatous effusions. *Acta Cytol* 2001;45:307-312.