

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A GYERMEKKORI OTITIS MEDIA
CATARRHALIS CHRONICA SEROSA
ETIOPATOMECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA**

Dr. Rezes Szilárd Gyula

Témavezető: Dr. Sziklai István



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Klinikai Vizsgálatok Doktori Program
Debrecen, 2011.

**A GYERMEKKORI OTITIS MEDIA CATARRHALIS
CHRONICA SEROSA ETIOPATOMECHANIZMUSÁNAK
VIZSGÁLATA**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Rezes Szilárd Gyula

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori
iskolája (Klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Dr. Sziklai István, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok:	Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
	Dr. Jóri József, kandidátus

A doktori szigorlat időpontja: 2011. június 15. 11 h

Az értekezés bírálói:

Dr. Kónya József, Ph.D.
Dr. Küstel Marianna, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok:	Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
	Dr. Jóri József, kandidátus
	Dr. Kónya József, Ph.D.
	Dr. Küstel Marianna, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2011. június 15. 13 h

1. BEVEZETÉS

A középfülgyulladás (*otitis media*) a korai gyermekkor egyik leggyakoribb gyulladásos betegsége. Életük első évtizedében a gyermekek 93%-a legalább egy alkalommal, míg 74%-a három vagy több alkalommal esik át középfülgyulladásra. Zárt dobhártya mellett a középfül üregrendszerében zajló gyulladásos folyamat lehet akut (*otitis media acuta serosa, otitis media acuta suppurativa*) vagy krónikus (*otitis media catarrhalis chronica serosa, OMCCS*) lefolyású. Az akut és krónikus formát egyaránt jellemzi dobüregi folyadékgyülem jelenléte, míg elkülöníti az akut gyulladásos jelek (láz, fájdalom, hiperémiás és elődomborodó dobhártya) megléte vagy hiánya. Az akut, leggyakrabban gennyes középfülgyulladás és az OMCCS – vagy hétköznapi terminológiával a krónikus szerózus otitis – között szoros összefüggés van. Széles körben elfogadott nézet, hogy nem két különálló kórképet, hanem egy betegség két stádiumát reprezentálják, ahol a krónikus szerózus otitis a korábban zajlott akut gyulladás nem gyógyult állapota. Akut középfülgyuladást követően 30 nappal a gyermekek 40%-ában, 3 hónappal a gyermekek 10%-ában észlelhető perzisztáló középfülváladék.

1.1. Az OMCCS klinikai jellemzői

Az OMCCS az 1 és 3 év közötti gyermekpopulációban a kórkép 10-30 % prevalenciát mutat és a 4 éves korcsoportban a kumulatív incidencia eléri a 80 %-os értéket. Nemi dominancia nem jellemző, azonos arányban jelentkezik fiú és lány gyermekeknél.

A betegség lényegét akut gyulladásra utaló klinikai tünetek és vizsgálati jelek nélkül a középfül üregében különféle stimulusok hatására felhalmozódó és perzisztáló változó viszkozitású folyadék adja. A felgyült váladék a hangvezető rendszer impedanciáját növelve a hangenergia egy részének elnyelődése révén vezetékes típusú halláscsökkenés kialakulásához vezet. Ez a kis fokú halláscsökkenés sokszor az első és egyetlen jele a betegség fennállásának, melyet gyakran csak gyermekkorai szűrő hallásvizsgálat tár fel. A dobüregi váladék eltávolítása, a dobüreg normális lég tartalmának visszanyerése esetén a halláscsökkenés tökéletesen reverzibilis.

Az OMCCS diagnózisát fülészeti és audiológiai vizsgálattal állítjuk fel. Otomikroszkópos vizsgálat során általában behúzódtott, ritkábban normális állású, mozgásában korlátozott dobhártyát látunk, mögötte folyadékkal kitöltött dobüreggel. A tisztahang küszöbaudiometria kisfokú halláscsökkenést, tympanometria lapos (B típusú) görbét igazol.

A kórkép kezelése konzervatív és sebészi úton történhet. Antibiotikumok használata nem javítja a tüneteket. Az intranazális vazokonstriktort okozó cseppek és az antihisztamin a placebo csoporthoz képest szignifikánsan nem gyorsítja a betegség gyógyulását. Levegő mesterséges bejuttatása a dobüregbe (akár fülkürt katéterezéssel, Politzer ballon használat vagy autóinfláció révén) csak átmeneti javulást hoz. A paracentézis, a ventillációs tubus beültetése és az adenotómia, illetve ezek kombinációja bizonyult hatékony kezelésnek.

1.2. Az OMCCS kialakulását elősegítő kóroki tényezők

Az OMCCS kialakulását elősegítő és lezajlását befolyásoló etiológiai faktorok közül a fülkürt diszfunkció, az adenoid hiperplázia, a szájpad hasadék, a felső légúti patogén vírusok és az allergia a legfontosabbak.

OMCCS-s gyermekek esetén a dobüregi váladékból leggyakrabban kimutatott patogén *vírusok*: a rhinovírus, az RS(respiratory syncytial)-vírus és a humán coronavírus. A vírusok kimutatása felveti azok etiopatogenetikai szerepét a kórkép kialakulásában, a kimutathatóság ténye azonban önmagában nem jelent ok-okozati összefüggést a vírusfertőzés és a váladék perzisztálása között. A leggyakrabban tanulmányozott patogén légúti vírus a rhinovírus, ami a közönséges nátha kórokozója. Középfülváladékból 0 – 40% gyakorisággal mutatható ki. Az enterovírusok által okozott légúti fertőzés szintén náthás tüneteket okoz. Az 2005-ben felfedezett humán bocavírus gyakran nem önálló fertőző ágens, hanem más vírusokkal együtt okoz megbetegedést. A HBoV jelenlétét és szerepét OMCCS-ban korábban nem vizsgálták.

Az OMCCS és az *allergia* összefüggésének vonatkozásában az irodalomban ellentmondó adatokat találunk, egyes szerzők megerősítik, mások vitatják a két kórkép közötti ok-okozati kapcsolatot.

1.3. Az OMCCS kialakulásának patomechanizmusa

A krónikus szerózus középfülgyulladásnak kialakulása alapján két fő formája különíthető el: 1) az akut középfülgyulladást

követően hosszan perzisztáló dobüregi folyadékkal jellemzett és 2) a szekretoros forma.

Ad 1). Az akut gyulladás lezajlása után tartósan perzisztáló dobüregi folyadék oka a csökkent fülkürt működéshez társuló gátolt középfül clearance. Egészséges clearance esetén a fülkürt dobüregi szájadéka környéki ciliáris epitélium csillószőreinek mozgása a fülkürt felé sodorja a mukózátt bevonó váladékot, ami aztán a fülkürtön keresztül az orrgaratba ürül. A gátolt clearance működés legfőbb okai: a) a ciliáris diszfunkció, b) a nyálkahártya ödéma és hiperplázia, c) a váladék fokozott viszkozitása és d) a középfül-orrgarat közötti nyomáskülönbség lehetnek. Ciliáris diszfunkciót bakteriális endotoxinok okozhatnak azáltal, hogy reverzibilisen bénítják a csillószőrök mozgását. Az akut gyulladásból visszamaradó ödéma és nyálkahártya hiperplázia elsősorban a fülkürt dobüreghez közeli szakaszán mechanikai akadályt képezve rontja a clearancet. A nagy viszkozitású, mukózus váladék mozgásban tartása ép ciliáris funkció mellett is nehezített. A középfül és az orrgarat közötti nyomáskülönbség növekedése tovább rontja a clearancet: egy adag váladék fülkürtbe továbbítása után tovább csökken a dobüregi nyomás, jobban retrahálódik a dobhártya és romlik a fülkürt működés hatékonysága. Ezt a formát a gátolt fülkürt működés, a csökkent középfülnyomás és a behúzódott dobhártya jellemzi. A negatív dobüregi nyomás ventilációs tubus beültetésével rendezhető, és a kórfolyamat spontán szanálódása várható.

Ad 2). A krónikus szerózus otitis szekretoros formája elsősorban idősebb gyermekekre jellemző, ahol akut

középfülgyulladásától függetlenül jelentkezik a betegség. A gyermekek többségénél azonban az anamnézisben itt is fellelhető a korai gyermekkorban akut középfülgyulladásos epizód. A váladéktermeléshez vezető feltételezett mechanizmus egy olyan elhúzódó antigén stimuláció, amely a szenzitizált mukózában szekréciós, exszudációs folyamatot indít el. Antigén stimulációhoz vezethet egyrészt az orrgarat felől transztubáris úton a dobüregbe jutó kórokozó (patogén vírusok), másrészt a nyálkahártya felszínén lévő biofilmben életképességét megőrző baktérium. Habár tenyésztéssel a középfülváladékból baktériumot izolálni nem lehet, PCR technikával a metabolikus aktivitást mutató baktérium jelenléte a váladékban igazolható. A szekretoros formában a fülkürt működése megtartott lehet, ami negatív dobüregi nyomás hiányában normális állású dobhártyaképpel társul.

A dobüregi váladékképződés alapvetően két folyamat útján jöhet létre: egy passzív, a mukóza mikrovaskulaturáján keresztül megvalósuló, az érpermeabilitás fokozódásához kötődő transzszudációs és egy aktív, szekréción alapuló exszudációs folyamat révén. A máj parenchima sejtjeiben termelődő albumin alacsony molekulamérete (Mr 68,000 protein) révén a szérumból könnyen átjut a kapillárisfalon a környező szövetekbe, így a középfülváladékban való megjelenése a transzszudációs folyamatot jelzi. Az immunglobulin jelenléte a középfülváladékban nagy mérete miatt (Mr150,000 protein) nem transzszudációs folyamat eredménye, hanem a dobüregi mukózában lévő aktivált B-sejtek termelik, így a lokálisan zajló gyulladásos folyamat markere.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink céljául a nagy prevalenciát mutató OMCCS kialakulásának hátterében álló etiológiai faktoroknak valamint a kialakulása mechanizmusának pontosabb megismerését tűztük ki.

Ad 1). A dobüregi váladékképződéshez vezető két kórfolyamat (az érpermeabilitás fokozódás következtében fellépő passzív transzszudáció és a nyálkahártya stimulációja révén létrejövő aktív exszudáció) jelenléte kimutatható a váladék albumin és immunglobulin koncentrációjának meghatározásával. Célunk volt a váladék albumin és immunglobulin-G koncentráció arányának meghatározásával a váladékminták feltételezett kórfolyamat alapján való elkülöníthetőségének vizsgálata, valamint a különböző váladékminták jellemzése a váladék citokin [proinflammatorikus (TNF- α és IFN- γ) és az inflammatorikus (IL-4 és IL-8)] összetétele alapján.

Ad 2). Az OMCCS kialakulásában kóroki tényezőként számon tartott gyakori felső légúti patogén vírusokat (rhino- és enterovírusok) referenciaként használva a közelmúltban felfedezett human bocavírus (HBoV) dobüregi váladékban való előfordulásának és esetleges etiológiai szerepének vizsgálatát tűztük ki célul.

Ad 3). Az OMCCS és az allergia kapcsolatát jellemző ellentmondó irodalmi adatok miatt célul tűztük ki a két kórkép epidemiológiai összefüggésének vizsgálatát.

3. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Betegek és anyagok

OMCCS fő- vagy társdiagnózissal műtétre került 1 és 13 év közötti gyermekeket vontunk be prospektív vizsgálatainkba. Az OMCCS diagnózisát fülészeti és audiológiai vizsgálattal állítottuk fel. A fülészeti vizsgálat során az otomikroszkópos kép akut gyulladásos jelek hiánya mellett zárt, transzparens, behúzódot dobhártyát mutatott tört, vagy hiányzó fényreflex-kúppal. Az audiológiai kivizsgálás a tisztahang küszöbaudiometriás vizsgálat során kisfokú (15-35 dB) vezetékes típusú halláscsökkenést, a tympanometria során az érintett oldalon lapos (B típusú) tympanogramot igazolt. A diagnózis felállítását követően 7-10 napos rendszerességgel végzett kontroll vizsgálatokkal erősítettük meg a betegség fennállását, miközben konzervatív kezelést alkalmaztunk dekongesztív orrcsepp, nyákoldó és antihisztamin formájában. A konzervatív kezelés ellenére hat héten át perzisztáló folyadékgyülem esetén vontuk be a gyermekeket a vizsgálatba

Adenotómia, tonsillectomia vagy tonsilloadenotómia és az érintett fülön paracentesis és/vagy ventillációs tubus beültetés során a dobüregi váladékot üvegszívóba nyertük. A váladékot makroszkópos jellemzői, viszkozitása alapján szerózus (tiszt, szalmasárga színű, víz sűrűségű) vagy mukózus (sűrű, ragasztószerűen nyúlós, glue-ear) csoportba soroltuk. A váladék mennyiségét milligramm pontossággal lemértük, majd 1ml steril PBS (Phosphate Buffered Saline) oldattal (pH 7,2) a szívóból Eppendorf csőbe mostuk. Viroológiai vizsgálatokhoz a mintákat

további felhasználásig -70 C-on tároltuk. Az immunológiai vizsgálatokhoz a mintákat előbb 3000-es fordulatszámon 5 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót tároltuk fagyaszttva.

Két, egymástól független, átfedés nélküli betegcsoportot vizsgáltunk. Az első betegcsoportba 56 gyermek tartozott (23 fiú; 4,9 év átlagéletkor; 0,9 és 12,6 év életkori szélsőérték), akiktől származó 88 fülváladékából a gyulladásos fehérjék koncentrációit határoztuk meg. A második betegcsoportot alkotó 54 gyermek (32 fiú; 5,4 év átlagéletkor; 2,8 és 9,8 év életkori szélsőérték) 75 fülváladékából végeztük el a víruskimutatásokat. Az allergológiai vizsgálatokat a második betegcsoport 54 gyermekéből 52-nél (31 fiú; 5,1 év átlagéletkor; 2,8 és 9,8 év életkori szélsőérték) tudtuk elvégezni, mivel két gyermek a posztoperatív időszakra tervezett vizsgálaton nem jelent meg.

3.2. Gyulladásos fehérjék kimutatása a középfülváladékból

3.2.1. Nefelometriás módszer albumin, immunglobulinok (IgG, IgM, IgA), komplement faktorok (C3, C4) és az akut fázis fehérje (C-reaktív protein, CRP) koncentrációjának mérésére

A minták albumin, C3 és C4 koncentrációját automatizált BN II. Dade-Behring Nephelometerrel (Dade Behring Marburg, Németország) mértük. A vizsgált fehérje (antigén) és a specifikus antiszérum (antitest) reakciója során képződő inszolubilis antigén-antitest komplex a keverékre bocsátott 840 nm hullámhosszú infravörös mérőfényt szórja. A szóródás mértékét fotodióda segítségével mérjük, amely arányos a minta fehérjetartalmával. A vizsgált fehérje koncentrációját a nefelométer a memóriájában tárolt

referencia görbék alapján adja meg. Mérési normál tartományok: albumin, 33-52 g/l; c3, 0,9-1,8 g/l és c4 0,1-0,4 g/l.

A minták IgG, IgA, IgM és CRP koncentrációját automatizált Cobas Mira Plus (Dako AS, Glostrup, Dánia) analizátorral mértük. A vizsgált fehérje és a gyári antiszérum reakciója során keletkező inszolubilis komplex által az interferencia szűrőn keresztül bocsátott monokromatikus fény elnyelődésének mértékét mérve és referencia görbéket használva határoztuk meg a vizsgált minta kérdéses fehérjéjének koncentrációját. Méréseink normál tartományai: IgG, 2,7-16 g/l; IgA, 0,07-4,0 g/l; IgM, 0,12-2,3 g/l és CRP, 0,0-5,0 mg/l.

3.2.2. ELISA módszer citokin koncentráció mérésére

Két proinflammatorikus (tumor nekrosis faktor- α , TNF- α ; interferon- γ , IFN- γ) és két inflammatorikus (interleukin-4, IL-4; interleukin-10, IL-10) citokin koncentrációját szendvics ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) módszerrel működő OptEIA humán citokin Set-ekkel (Pahrmingen, San Diego, California, USA) határoztuk meg. A 96 lyukú mikrotitráló lemez aljára kitapasztolt specifikus anti-human citokin antitesthez kötődik a mintában található vizsgált citokin. Az immobilizált citokinhez biotinnal konjugáltatott anti-citokin antitestet és avidin-HRP konjugátumot adunk, ahol a strepavidin kötődik a biotinhoz, és a peroxidáz színreakció kíséretében a rendszerhez adott tetrametilbenzidin szubsztrátját bontja. A színreakció intenzitása arányos az első lépésben lekötött citokin koncentrációjával, amit ismert koncentrációjú citokin standardok segítségével adunk meg pg/ml egységben.

3.3. Vírusok kimutatása a középfülváladékból

3.3.1. Picornavírusok (rhino- és enterovírusok) kimutatása – reverz transzkripció, polimeráz láncreakció és hibridizációs módszer (RT-PCR-H)

A dobüregi váladékban lévő RNS-t 100 µl mintából kereskedelmi forgalomban kapható RNS izoláló kit (QIAamp, QIAGEN GmbH, Hilden, Németország) segítségével extraháltuk. Öt µl tisztított RNS-t reverz transzkripció során cDNS-é alakítottunk rhino-enterovírus specifikus primerek felhasználásával. A cDNS-ből 5 µl-t PCR során amplifikáltunk. Az alkalmazott primerek a vírus RNS szál 5' végén lévő nem kódoló régió (NCR) komplementerei voltak. Ezen szekvenciák a rhinovírusok és az enterovírusok esetében azonosak, így a PCR során a genetikai anyag amplifikációja a két víruscsoportra nézve szimultán történt. A primerek nukleotid sorrendje 5'-GAAACACGGACACCCAAAGTA-3' és 5'-TCCTCCGGCCCCTGAATG-3', a próbáié 5'-AGGGTTAAGGTTAGCC volt. Pozitív kontrollként az alábbi vírusokat használtuk: human rhinovírus-2, Cocksackie vírus-A16 és -B5 illetve echovírus-23. Minden lépésnél több negatív kontrollt is alkalmaztunk.

A PCR ampliconok identifikálása folyékony fázisú hibridizációs módszerrel történt³³. Streptavidinnel bevont microtiter tálcára adagoltunk 10 µl PCR terméket, és 50 mM NaOH oldattal denaturáltuk a cDNS-t. A DNS szál lemosása után két Europiummal jelölt oligonukleotid próbával (egy a rhinovírusoknak és egy az enterovírusoknak) (Wallac Oy, Turku, Finnország) hibridizációt

végeztünk 37 °C-on 30 percig 40 mM Tris-HCl (pH 7,5) közegben. Az Európium fluoreszcenciájának mértékét fluoriméterrel mértük meg. Pozitívnak véleményeztük a vizsgált mintát, ha a fluoreszcencia mértéke a negatív kontroll minták átlagértékét legalább az átlagtól való standard deviáció ötszörösével haladta meg.

3.3.2. HBoV kimutatása kvantitatív PCR-rel

A középfülváladékból (szerózus mintáknál 200 µl, mukózus mintáknál 20 mg felhasználásával) DNS izolálást végeztünk a kereskedelmi forgalomban kapható QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) felhasználásával. A 200µl desztillált vízben oldott DNS elegy 5µl-ét mértük a reakció oldatokhoz, így együttesen 25µl-es reakció elegy térfogatot alkalmaztunk. A PCR-hez TaqMan univerzális PCR master mix-et (PE Applied Biosystems) használtunk, mellyel a NP1 gén egy részletét amplifikáltuk. A mérési eredmény pozitív volt, ha a HBoV ST2 plazmid mennyisége elérte a 10 kópia/µl értéket. A kontamináció kiküszöbölése érdekében a minták, és a PCR reagensek előkészítése lamináris áramlású szekrényben, külön helyiségekben történt. Negatív kontrollként vizet használtunk.

3.4. Allergológiai vizsgálatok

3.4.1. Anamnesztikus adatok allergia vonatkozásában

Az anamnézis felvétele során a korábban már diagnosztizált allergiás kórképekről (pl. atópiás dermatitisz, szénanátha, asztma, ételallergia) illetve allergiás hajlamra utaló tünetekről (évszakhoz kötött tüsszögés és orrcsorgás, bizonyos ételek fogyasztása után

jelentkező enterális panaszok, gyógyszerérzékenység, stb.) gyűjtöttünk információt.

3.4.2. Prick teszt

Az intrakután Prick tesztet kereskedelmi forgalomban kapható allergén keverékekkel végeztük (HAL Priktest, Haarlems Allergen Laboratorium B.V., Haarlem, Hollandia), melyek alkalmazásával 20 gyakori allergénnel/allergéncsoporttal szembeni túlérzékenységet vizsgáltuk. Az allergiás bőrreakció mértéke alapján az adott allergénnel szembeni túlérzékenység mértékét négyfokozatú (egyőtől négy keresztig) vizuális pozitivitási skála alapján jellemeztük.

3.4.3. Szérum össz-IgE koncentrációjának vizsgálata

A méréseket az ADALTIS Personal Lab Allergy ELISA automatán végeztük. A minta össz-IgE koncentrációját az ELISA elegyen átbocsájtott 450 nm-es fény abszorpcióját mérve fotometriás módszerrel határozzuk meg. A szérum össz-IgE koncentrációját - a gyermekkori határértéket minden korcsoportban biztosan meghaladó -120 kU/l érték felett tekintettük.

3.4.4. Szérum allergén specifikus IgE koncentrációjának vizsgálata

Negyven inhalatív és negyven nutritív allergénnel vagy allergén csoporttal szemben termelt specifikus IgE koncentrációt automatizált szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg, ahol a kemilumineszcencia mértékét CLA-1 Luminométerrel mérünk meg. A mintákat hatfokozatú pozitivitási osztályokba soroltuk, ahol a 0, 1/0 és 1 érték az adott allergénnel szembeni alacsony reakciót

(allergia negatív), a 2, 3 és 4 érték pedig túlérzékenységet (allergia) jelezi.

3.4.5. Kontroll csoport allergén specifikus IgE-k előfordulási gyakoriságának elemzéséhez

Az allergén specifikus IgE-k előfordulási gyakoriságát saját eredményeink és a kontroll csoportként választott 818, légúti és/vagy enterális panaszokkal általános gyermekgyógyászati járóbeteg szakrendelésen és/vagy allergiás panaszokkal gyermek allergológiai szakrendelésen vizsgált, 1 és 6 év közötti életkorú gyermek allergén specifikus IgE eredményeinek összehasonlításával elemeztük. A vizsgálati és kontroll csoport életkori és nembeli összetétele nem mutatott eltérést.

3.5. Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzést a Windows Statisztikai Analitikai Programjával, 8.2 verzió végeztük (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Az immunológiai vizsgálatok során mért fehérjekoncentrációkat az átlag, az átlagtól való eltérés (standard deviáció, SD), a középérték és a középértékhez tartozó kvartilisek megadásával jellemeztük. Az albumin és globulin koncentráció hányadosa alapján képzett csoportok közötti különbséget az értékek logaritmikus transzformációja után a Student-féle T-teszttel elemeztük.

A virológiai betegcsoportban a fülváladék viszkozitása alapján képzett két csoport vírus prevalenciájának összehasonlítását a Fisher exact teszt alkalmazásával végeztük. Ugyanezen betegcsoport és a választott kontrollcsoport között a szérum allergén

specifikus IgE pozitívítását a khi-négyzet próbával vizsgáltuk, ahol a szignifikancia mértéke $p \leq 0,05$ volt.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A középfülvádék gyulladásos fehérjéinek vizsgálatával nyert eredményeink

4.1.1. A középfülvádékok megoszlása a váladék albumin és IgG koncentrációjának aránya alapján

A kontroll csoportot alkotó 31 egészséges gyermek vérvizsgálata során a szérumban albumin és IgG koncentrációjának hányados (A/G) értékei normális eloszlást mutattak (közép $\pm$ SD = $4,12 \pm 1,13$). Az 56 beteg gyermek 88 középfülvádékát a váladék A/G értéke alapján két, egymástól élesen elkülönülő csoportba soroltuk. A két csoport közötti határértéket (0,73) úgy határoztuk meg, hogy a kontroll csoportot jellemző szérumban A/G középértékből (4,12) háromszor kivontuk a hozzá tartozó SD értéket (1,13). A határértéknél kisebb A/G hányadost (A csoport; $A/G < 0,7$) 13 gyermek 16 fülvádékában találtunk (18,2%), míg a határértéket meghaladó A/G hányadost (B csoport; $A/G > 0,7$) 43 gyermek 72 fülvádékában mértünk (81,8%).

4.1.2. A váladékok IgA, IgM, C3, C4 és CRP tartalma

Amíg az albumin és az IgG koncentrációja minden mintában elérte a kimutathatóság mértékét, addig az IgA, IgM, C3 és C4 esetében csak a minták 98,8%, 68,1%, 68,1% és 38,6%-ában volt meghatározható a koncentráció. CRP egyetlen mintában volt jelen mérhető mennyiségben, így ennek további elemzésétől

eltekintettünk. A váladék A/G értéke alapján képzett két csoport IgA, IgM, C3 és C4 koncentráció értékei között nem találtunk szignifikáns eltérést.

4.1.3. A két váladékcsoport citokin összetételének összehasonlítása

Az A csoportot a TNF- α (A csoport 2,75 pg/ml; B csoport 0,0001 pg/ml; $p < 0,001$) és az IFN- γ (A csoport 7,80 pg/ml; B csoport 0,0001 pg/ml; $p < 0,0001$) szignifikánsan magasabb koncentrációja jellemzi. A B csoportban az IL-4 (B csoport 6,54 pg/ml; A csoport 0,73 pg/ml; $p < 0,001$) és az IL-10 (B csoport 13,26 pg/ml; A csoport 0,84 pg/ml; $p = 0,019$) a szignifikánsan domináns citokin. Igen erős korrelációt találtunk a vizsgált citokinek koncentrációja és az A/G érték között, pozitív összefüggést az IL-4 ($r = 0,58$) és IL-10 ($r = 0,36$), valamint negatív korrelációt az IFN- γ ($r = -0,62$) és a TNF- α ($r = -0,66$) között.

4.1.4. A két váladékcsoport összehasonlítása a betegek klinikai adatai alapján

Összehasonlítva a korábban adenotómián és/vagy ventilációs tubus beültetésen már átesett illetve át nem esett betegcsoportokat nem találtunk statisztikailag szignifikáns összefüggést a fülváladék egyetlen vizsgált fehérjekomponense vonatkozásában sem.

4.2. A középfülváladék virológiai vizsgálatai során nyert eredményeink

4.2.1. Virus pozitív középfül váladék minták

A vizsgált 75 váladékmintából 26 esetben (34,7%) volt kimutatható virális nukleinsav jelenléte; 22 váladékban (29,3%) enterovírus, 10 váladékban (13,3%) rhinovírus és 2 esetben (2,7%) bocavírus. A két HBoV pozitív minta kópiaszámai: a mukózus váladékban 4,4 HBoV genom kópia/ml, a szerózus váladékban 596 kópia/ml. A 26 vírus pozitív mintából 19-ben csak egyetlen vírus volt kimutatható; 15 mintában (78,9%) enterovírus, háromban (15,8%) rhinovírus és egyben (5,3%) bocavírus. Hat mintában kettős vírusfertőzést igazoltunk (rhinovírus és enterovírus együtt) és egy váladékban mindhárom vizsgált vírus genetikai anyagát detektáltuk.

4.2.2. A középfülváladék viszkozitása és vírus pozitivitás

A váladék viszkozitása alapján a mintákat két csoportba, szerózus és mukózus csoportba soroltuk. A mukózus váladék esetén a vírus pozitív minták aránya (kivéve a bocavírust) magasabb volt, mint a szerózus csoportban, bár a statisztikai próba nem igazolt a két csoport között szignifikáns különbséget.

4.2.3. Kétoldali krónikus szerózus középfülgyulladás és a váladék vírus pozitivitása

Huszonegy (39%) gyermeknél diagnosztizáltunk kétoldali OMCCS-t, míg 33 esetben (61%) egyoldali volt a betegség. A 21 kétoldali betegségben szenvedő gyermek felénél (12 eset; 57%) adott a vírusizolálás a két fül vonatkozásában azonos eredményt: 8 esetben mindhárom vizsgált vírusra negatív lett, míg 3 gyermeknél a

kétoldali váladékpár enterovírusra, 1 gyermeknél rhino- és enterovírusra volt pozitív. Nem volt olyan gyermek, akinél a váladékpárból eltérő vírusok lettek volna kimutathatók. Kilenc gyermeknél (43%) az egyik oldali váladék vírus negativitása mellett a másik oldali váladékban 1 esetben rhinovírus, 5 esetben enterovírus, 2 esetben rhino- és enterovírus együtt és 1 esetben mindhárom vírus jelen volt.

4.3. Az OMCCS betegcsoport jellemzése az allergológiai vizsgálatok alapján

4.3.1. Allergológiai anamnézis

Az 52 gyermekből 15-nél (28,8 %) szerepelt az anamnézisben már korábban diagnosztizált allergiás megbetegedés; 3 esetben allergiás rhinitisz és asztma együttesen, 3 esetben allergiás rhinitisz önmagában, 2 esetben asztma önmagában, 3 esetben tehéntej allergia, 2 esetben tojás allergia, 2 esetben atópiás dermatitisz; míg további 3 (5,8%) gyermeknél a tünetek alapján valószínűsíthető volt allergiás megbetegedés. 34 (65,4%) gyermeknél az allergológiai anamnézis negatív volt (9. táblázat).

4.3.2. Prick teszt

A 18 (34,6%) Prick teszt pozitivitást mutató gyermeknél átlagosan 2,6 (1 és 8 között) allergénnel (allergéncsoporttal) szemben igazolódott hyperszenzitivitás, melyek közül a leggyakoribbak a háziporatká (66,6%), a parlagfű (44,4%), a gabona keverék (33,3%) és a penészgomba keverék (27,7%) voltak.

4.3.3. Szérum össz-IgE koncentráció

A szérum össz-IgE koncentrációja csak 5 (9,6%) gyermeknél haladta meg a referencia értéket.

4.3.4. Allergén specifikus IgE pozitivitás

A gyermekek 2/3-ánál (35 eset, 67,3%) igazolódott allergén specifikus IgE pozitivitás.

4.3.5. OMCCS betegcsoport és a kontrollcsoport összehasonlítása az allergén specifikus IgE vizsgálatok eredményei alapján

Az OMCCS betegcsoportban a kontrollcsoporthoz viszonyítva mind az inhalatív, mind a nutritív allergének vonatkozásában szignifikánsan gyakoribb volt az allergén specifikus IgE pozitivitás.

5. MEGBESZÉLÉS

A gyermekkori OMCCS esetében a dobüregi váladék képződése és perzisztálása egy komplex, minden részletében máig tisztázatlan, immunológiai alapokon nyugvó gyulladásos folyamat következménye. A kiváltó stimulustól függetlenné váló közös út a dobüregi mukózában zajló hosszantartó gyulladásos folyamat, amit aktivált gyulladásos sejtek és azok gyulladásos mediátorai tartanak fenn. A dobüregi váladék összetevőinek (akár gyulladásos mediátorok és sejtek, akár víruspartikulumok tekintetében) és a beteg szervezet egészének (allergiás állapot) vizsgálata a dobüregi váladékképződés folyamatának jobb megértését segíthetik elő.

A váladék albumin és immunglobulin-G koncentráció aránya alapján két, egymástól markánsan különböző váladékcsoportot különítettünk el.

Az $A/G > 0,7$ csoportra a váladék emelkedett albumin koncentrációja jellemző. Mivel az albumin kizárólag a májsejtekben termelődik, azok megjelenése dobüregi váladékban a dobüri nyálkahártya kapillárisain keresztül megvalósuló transzszudációs folyamat eredménye. Emelkedett albumin koncentráció fokozott érpermeabilitást és következményes fokozott albumin extravazációt jelez. Az érpermeabilitás fokozódás vazoaktív gyulladásos mediátorok, úgymint hisztamin, prosztaglandinok, aktivált komplementek, arachidonsav metabolitok illetve immunkomplexek hatására jön létre. Ezen mediátorokat granulociták termelik és juttatják az intersticiális térbe; részben bakteriális fertőzés által aktivált neutrofil granulociták, részben pedig lokális allergiás reakció során felhalmozódott eozinofil granulociták és mastociták. Ezen gyulladásos sejtek citokinek, többek között IL-4 és IL-8, hatására aktiválódnak; enzimeket, kemoattraktáns citokineket és vazoaktív fehérjéket juttatva környezetükbe.

A másik váladékcsoportban, ahol az $A/G < 0,7$ a dobüregi váladék exszudációs folyamat eredménye. A csoportot jellemző alacsony albumin koncentráció normális mikrovaskuláris permeabilitást jelez. Ez a váladéktípus nagyobb számú T-, és B-sejttel, monocyta-macrofággal és az aktivált B-sejtek által termelt nagyobb mennyiségű immunglobulin-G-vel jellemezhető.

Vizsgálatunk során szignifikáns összefüggést találtunk a váladék A/G aránya és a citokin koncentrációja között. Alacsony A/G érték emelkedett TNF- α és IFN- γ szinttel társul, míg magas A/G érték esetén az IL-4 és IL-10 a domináns citokin.

A dobüregi váladék citokin összetételének vizsgálata alapján valószínűsítjük, hogy az A/G<0,7 csoportban a proinflammatorikus citokinek (TNF- α és IFN- γ) magas koncentrációja fokozott B és Th1 sejt aktivitást jelez. Ezzel szemben a másik, a magas albumin koncentrációval jellemzett váladékcsoportban az emelkedett IL-4 és IL-10 aktivált Th2 limfociták jelenlétére utal. Az előbbi csoportot hipotetikusán az OMCCS szekretoros formájával azonosítjuk, míg az utóbbinál a korábbi akut gyulladás után visszamaradó folyadékgyülemmel jellemezhető forma véleményezhető

Virológiai vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az OMCCS-ban szenvedő gyermekek fülvadászából az esetek 34,7%-ban kimutatható respiratórikus vírus nukleinsav PCR vizsgálattal. Gyakorisági sorrendben az enterovírusok (29,3%), majd a rhinovírusok (13,3%) végül a human bocavírus (2,7%) fordult elő a mintákban

A mintáinkat jellemző jelentős rhinovírus pozitivitás egybevág az irodalmi adatokkal. Egy lezajlott rhinovírus fertőzés a vírus genom perzisztálása miatt akár 8 hétig is kimutatható marad PCR-rel, így ha a gyermek hetekkel a mintavétel előtt átesett egy rhinovírus fertőzésen, a koincidencia lehetősége nem zárható ki. Saját eredményeink interpretálásának egyik bizonytalanságát éppen

az adja, hogy nem minden esetben állt rendelkezésünkre elegendő információ a műtétet megelőző teljes 8 hét felső légúti hurutos anamnézisének illetően. Irodalmi adatokkal szemben a saját anyagunkban az enterovírus prevalenciája igen magas, 29,3% volt. A vírus nukleinsav kimutathatósága a középfülvázadékból azonban nem feltétlenül jelent ok-okozati összefüggést a vírusfertőzés és a fennálló középfülbetegség között.

A közelmúltban felfedezett humán bocavírus elsősorban gyermekkori akut légúti fertőzések során került gyakran izolálásra. Munkacsoportunk elsőként izolált OMCCS fülvázadékból a HBoV-t. Az általunk észlelt alacsony prevalencia (2 pozitív minta a vizsgált 75-ből; 2,7%) magyarázható a vizsgált kórkép krónikus jellegével, hiszen akut gyulladásos légúti váladék esetén is a HBoV kimutathatósága nem éri el a 8%-os prevalenciát.

Érdekes megfigyelésünk, hogy nagyobb arányban észleltünk vírus pozitív mintákat a mukózus típusú váladékok esetén, mint a szerózus csoportban. Experimentális vizsgálat igazolja, hogy a dobüregi mukózából származó epitéliális sejtenyészett inflamatórikus citokinek (pl. TNF- α) hatására fokozott mukopoliszacharid termelést mutat. Jól ismert tény, hogy a virális nukleoproteinek hatékonyan stimulálják a gyulladásos T-sejteket TNF- α , és más proinflammatórikus citokinek termelésére.

Nagyszámú klinikai epidemiológiai vizsgálat igazolja az OMCCS és az allergia gyakori együttes előfordulását.

Betegeink anamnesztikus adatai alapján észlelt prevalencia kissé alatta marad az irodalmi adatoknak: allergiás rhinitisz 11,5% (6

eset), asztma 9,6% (5 eset) és dermatitisz 3,8% (2 eset), sőt allergiás rhinitisz esetében a populációra jellemző becsült átlagértéket (20%) sem éri el. Az allergiás bőrteszt során tapasztalt 34,6%-os pozitívítási arányunk illeszkedik az irodalmi adatokhoz, ahol ez 24% és 100% közötti értékeket vesz fel.

Saját beteganyagunkban mindössze 5 gyermeknél (9,6%) észleltünk emelkedett szérum össz-IgE koncentrációt. OMCCS gyermekből álló betegcsoport atópiás és nem atópiás alcsoportja között irodalmi adatok nem igazolnak eltérést a szérum össz-IgE koncentrációjában, ami a vizsgálat klinikai értékét megkérdőjelezi.

Saját beteganyagunkban mind összesen, mind pedig külön az inhalatív és külön a nutritív allergének esetében is, az allergén specifikus IgE koncentráció a kontrollcsoporthoz viszonyítva szignifikánsan magasabb volt ($p < 0,001$).

Az OMCCS és a különféle allergiás megbetegedések illetve a pozitív allergológiai vizsgálati leletek gyakori együttes jelenléte az allergia pozitív OMCCS betegcsoportban valószínűsíti a hiperszenzitivitási reakció kóroki szerepét a dobüregi folyadékgyülem kialakulásában.

6. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Az OMCCS kialakulását előidéző kóroki tényezők illetve a kialakulásához vezető kórfolyamatok vizsgálata során a következő új megállapításokat tettük.

Ad 1). Felismertük, hogy a dobüregi váladék albumin és immunglobulin-G koncentráció aránya alapján a minták két, egymástól markánsan elkülöníthető csoportba sorolhatók. A két csoportot eltérő citokin összetétel és eltérő feltételezett kórfolyamat jellemzi. A magas albumin koncentráció mellett az inflammatórikus citokinek (IL-4 és IL-10), alacsony hányados esetén pedig a proinflammatórikus citokinek (TNF- α és IFN- γ) dominanciája figyelhető meg. Az első csoportot a váladékképződés transzszudációs formája, a magas Th1 és granulocita szám, valamint a csökkent fülkürtműködés jellemzi, míg a második csoportban B- s Th2-sejt fokozott aktivitás mellett az exszudációs mechanizmus vezet váladék felhalmozódáshoz.

Ad 2). Elsőként mutattunk ki az OMCCS esetén perzisztáló dobüregi váladékból HBoV fertőzést. A HBoV alacsony prevalenciája (2,7%) alapján azonban nem állítható fel ok-okozati kapcsolat a két kórkép között.

Ad 3). Epidemiológiai vizsgálattal igazoltuk az OMCCS és az allergia gyakori együttes előfordulását, valamint azt, hogy az OMCCS esetén gyakoribb az allergia előfordulása, mint a normális kontrollcsoportban.

7. KÖZLEMÉNYEK, ELŐADÁSOK

Az értekezést megalapozó in extenso nemzetközi közlemények:

1. **Rezes S**, Késmárki K, Sipka S, Sziklai I: Characterization of otitis media with effusion based on the ratio of albumin and immunoglobulin G concentrations in the effusion. Otol Neurotol 2007, **28(5)**: 663-7
Impakt faktor: 1.410
Független citáció: 3
2. **Rezes S**, Söderlund-Venermo M, Roivainen M, Kemppainen K, Szabó Z, Sziklai I, Pitkäranta A: Human bocavirus and rhino-enteroviruses in childhood otitis media with effusion. J Clin Virol. 2009, **46(3)**:234-7
Impakt faktor: 3.320
Független citáció: 1
3. **Rezes S**, Tóth L, Papp Z, Sipka S, Sziklai I: Evaluation of the relationship between allergy and otitis media with effusion in children. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2010 (közlésre beküldve)

Az értekezést megalapozó magyar nyelvű közlemények:

1. Késmárki K, Sipka S, Alexa M, Lakatos G, **Rezes Sz**, Szegedi Gy, Sziklai I: Dobüregi váladék immunológiai vizsgálata gyermekkori otitis media catarrhalis chronica serosa esetén. Fül-orr-gégegyógyászat 2001, **47(1)**: 28-32
2. **Rezes Sz**, Tóth L, Sipka S, Sziklai I: A gyermekkori otitis media catarrhalis chronica serosa (OMCCS) és az allergia

összefüggésének vizsgálata. Fül-orr-gégegyógyászat 2009,
55(4): 165-69

Egyéb nemzetközi közlemények:

1. Papp Z, **Rezes S**, Jókay I, Sziklai I: Sensorineural hearing loss in chronic otitis media. Otol Neurotol 2003, **24(2)**: 141-4

Impakt faktor: 1.073

2. Hajas A, Szodoray P, Barath S, Sipka S, **Rezes S**, Zeher M, Sziklai I, Szegedi G, Bodolay E: Sensorineural hearing loss in patients with mixed connective tissue disease: immunological markers and cytokine levels. J Rheumatol. 2009, **36(9)**:1930-6

Impakt faktor: 3.282

Egyéb magyar nyelvű közlemények:

1. Papp Z, **Rezes Sz**, Jókay I, Sziklai I: Percepció nagyothallás kialakulása időlt gennyek középfülgyulladásban. Fül-orr-gégegyógyászat 2000, **46(2)**: 99-106
2. **Rezes Sz**, Sziklai I: Van-e klinikai értéke a tonsilla szövettani vizsgálatának tonsillectomia után? Fül-orr-gégegyógyászat 2002, **48(1)**: 30-3
3. **Rezes Sz**, O'Donoghue G, Sziklai I: Az életkor szerepe a praelingualis süket gyermekek cochleáris implantáció utáni

halláshabilitációjában: meta-analízis. Fül-orr-
gégégyógyászat 2003, **49(4)**: 207-15

Az értekezéshez kapcsolódó nemzetközi előadások:

1. **Rezes S**, Sipka S, Sziklai I: Inflammatory and immune proteins in the middle ear effusion of otitis media with effusion. 6th International Conference of PhD students, 12-18 Aug. 2007, Miskolc
2. **Rezes S**, Pitkäranta A, Sziklai I: Presence of human bocavirus and rhino-enteroviruses in otitis media with effusion in children. 8th International Conference of the ESPO, 8-11 June 2008, Budapest

Az értekezéshez kapcsolódó hazai előadások:

1. Késmárki K, **Rezes Sz**, Sipka S, Sziklai I: Serosus otitisben végzett allergológiai és immunológiai vizsgálatok klinikánkon (1998.01.01 - 2001.12.31). P 21. Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesülete 37. Nemzeti Kongresszusa, Siófok, 2002. október 2-5.
2. **Rezes Sz**, Késmárki K, Sziklai I: A chronicus serosus középfülgyulladás jellemzése gyulladásos mediátorokkal. Észak-kelet Magyarországi Regionális Szakcsoporthülés, Fehérgyarmat, 2003. április 18.
3. **Rezes Sz**, Szilvássy J, Sziklai I: Meddig krónikus a krónikus középfülgyulladás? MFOGE Gyermek Fül-Orr-

- Gége Szekciójának XVI. Vándorgyűlése, Gyula, 2005. május 26-28.
4. **Rezes Sz**, Sziklai I: Otitis media chronica catarrhalis serosa gyorsdiagnosztikája és kezelése. Észak-kelet Magyarországi Regionális Szakcsoporthülés, Debrecen, 2005. november 11.
 5. **Rezes Sz**, Sziklai I: Atópiás és/vagy vírusos eredetű az otitis media chronica serosa gyermekkorban? Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesülete Tudományos Ülése, Budapest, 2008. szeptember 26.
 6. **Rezes Sz**, Makó L, Szabó Zs, Pitkáranta A, Sziklai I: A Human Bocavírus és a Rhino-enterovírusok etiológiai szerepének vizsgálata gyermekkori szerózus középfülgyulladásban. Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesülete 40. Nemzeti Kongresszusa, Siófok, 2008. október 15-18.
 7. **Rezes Sz**, Lauhio A, Sziklai I: Összefüggés a mátrix metalloproteázok koncentrációja és aktivitása valamint a dobüregi váladék viszkozitása között gyermekkori krónikus szerózus középfülgyulladásban. MFOGE Gyermek Fül-Orr-Gége Szekciójának XVIII. Vándorgyűlése, Balatonalmádi, 2009. március 26-28.