

## Dobüregi váladék immunológiai vizsgálata gyermekkori otitis media catarrhalis chronica serosa esetén

Késmárki Katalin dr., Sipka Sándor dr.\*, Alexa Magdolna\*, Lakos Gabriella dr.\*,  
Rezes Szilárd dr., Szegedi Gyula dr.\*, Sziklai István dr.

### ÖSSZEFOGLALÁS:

A szerzők összefüggést kerestek 31 (1–14 éves) otitis media catarrhalis chronica serosa (OMCCS) betegségben szenvedő gyermek 50 dobüregi váladékában az immunglobulinok (IgG, IgA, IgM), komplement faktorok (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>), az akut fázis fehérje: C-reaktív protein (CRP), továbbá néhány citokin: tumor nekrosis faktor alfa (TNF), gamma interferon (IFN), interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) mennyisége között.

Az immunglobulin, a CRP és komplement vizsgálatok lézer-nefelometriával, a citokin meghatározások ELISA-módszerrel történtek. A vértamináció miatt fehérje analitikai vizsgálatokra azonban csak 13 gyermek 16 fülvadásék-mintája bizonyult alkalmasnak. Pozitív korrelációt találtak az IgG–IgA, IgG–C<sub>3</sub>, IgG–C<sub>4</sub> szintek emelkedése között. Az IgM emelkedéshez társult a C<sub>3</sub> és a C<sub>4</sub> szintjének növekedése is. A citokinek és immunglobulinok összefüggésében szignifikáns korreláció csak a TNF–IgM és az IL-10–IgM koncentrációk emelkedése között volt. Az emelkedett citokin szintek társulásában csak a TNF és az IFN között tudtak szignifikáns kapcsolatot kimutatni. A C<sub>3</sub> és C<sub>4</sub> szintek párhuzamosan emelkedtek. A vizsgálatok megerősítik azokat a korábbi részmegfigyeléseket, amelyek az OMCCS esetében a dobüregi váladékban fokozott mennyiségben mutattak ki immunglobulinokat, komplementet és citokin fehérjéket. Ezen eredmények újdonsága az, hogy itt komplex módon, együttesen igazolták ezeknek a gyulladós fehérjéknek a fokozott termelődését. A jelenség magyarázata az, hogy az OMCCS-ben a dobüregben együtt vannak jelen az immunglobulint termelő B limfociták, a komplement faktorokat és citokineket egyaránt termelő monociták/makrofágok, valamint a citokintermelő T sejtek. **KULCSSZAVAK:** akut fázis fehérje, citokin, dobüregi váladék, immunglobulin, komplement, otitis media catarrhalis chronica serosa

### SUMMARY:

The authors examined a putative correlation between the amount of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM), complement factors (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>), acute phase protein: C-reactive protein (CRP) and some cytokin: tumour necrosis factor alpha (TNF), gamma interferon (IFN), interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) in 50 middle ear fluids of 31 (1-14 year old) children suffering from otitis media with effusion (OME).

The immunoglobulin, the CRP and complement measurements were carried out by laser-nephelometry whereas, the cytokin determinations by the ELISA method. Because of blood contamination only 16 middle ear fluids of 13 children proved appropriate for evaluation. Positive correlation was found between the IgG–IgA, IgG–C<sub>3</sub>, IgG–C<sub>4</sub> levels. The increase in the levels of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> were associated with the elevation of IgM. Significant correlations were found between TNF-alpha and IgM, IL-10 and IgM, TNF alpha and IFN-gamma. C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> levels increased in parallel. The examinations confirm those previous observations that showed immunoglobulins, complements and cytokins present in the middle ear fluid in otitis media with effusion.

The results call attention to the simultaneous occurrence of B lymphocytes, monocyte/macrophages and T helper-1 and 2 cells in the middle ear fluid in OME and prove, that a local immune response is present in the disease.

**KEYWORDS:** acute phase protein, cytokin, tympanic secretion, immunoglobuline, complement, otitis media with effusion

Közlésre érkezett: 2000. 05. 05.  
DEOEC Fül-orr-gégeklinika,  
Cím: 4012 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.  
Telefon: (52)414-763  
E-mail: isziklai@jaguar.dote.hu

## Bevezetés

Az OMCCS dobüregi savós váladék felszaporodásával járó betegség, amelyben heveny gyulladós tüneteket nem észlelünk. A betegség vezető tünete a nagyothallás, amely vezetékes típusú. Gyógyításában csak az Egyesült Államokban évente kb. 500 ezer ventilációs tubus beültetésére kerül sor (4). Az OMCCS etiológiája nem teljesen ismert, de minden bizonnyal több tényező is szerepet játszik a kialakulásában (1). Jelenlegi elképzelések szerint, mind a lokális dobüregi, mind általános immunológiai rendellenességek, továbbá az inadekvát fülkürtműködés kóroki szerepű. A heveny bakteriális és/vagy vírusfertőzések egyaránt az immunkompetens sejtek aktiválásához vezetnek a dobüregben és szekretoros IgA, IgG emelkedést (8) és a citokinek termelődését okozzák (2, 11, 12). Ismeretes, hogy a T1 típusú helper limfociták főleg IFN-t és IL-2-t termelnek, a Th2 típusú sejtek pedig IL-4, 5, 6, 8 és 10-t (3, 5). A TNF és az IL-1 főleg a monocita makrofág rendszer jellemző citokinje, bár TNF-t termelhetik a Th2 sejtek is (10). Jelen munkánkban egyszerre vizsgáltuk az OMCCS-ben szenvedő gyermekek dobüregi váladékában az immunoglobulinok (IgG, IgA, IgM), komplement fehérjék (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>), továbbá a Th1 sejtekre jellemző IFN, a Th2 sejtekre jellemző IL-4 és IL-10, a monocita makrofág rendszerre jellemző TNF mennyiségeket, és azok egymáshoz való viszonyát (2, 6, 7, 11, 12).

## Betegek és módszerek

A kizárólag OMCCS diagnózis miatt adenotómiára kerülő 31 gyermek (21 fiú, 10 lány) mindkét oldali paracentézist végeztünk. A betegek átlag életkora 4,9 év volt (a két szélső érték: 11 hónap és 13 év).

Paracentézist követően, a dobüregi szívóra erősített, steril folyadékcsapdába gyűjtöttük a váladékot. Erre a célra némileg átalakított 2 ml-es steril fecskendő használtunk. Átlagosan 0,05–0,14 ml váladékot tudtunk leszívni. Az így nyert mintát minden esetben 1 ml-re egészítettük ki, pufferolt fiziológiás sóoldattal (PFS, pH = 7,2), majd 24 órán keresztül állni hagytuk. A centrifugált minták felülúszóiból végeztük el a fehérje analitikai vizsgálatokat. Az 50 mintában megvizsgáltuk az albumin, az immunoglobulinok, a komplement komponensek, továbbá az akut fázis fehérje mennyiséget. Csak 13 gyermek 16 mintáját

találtuk alkalmasnak további analízisre és citokin meghatározásokra. Ezekben kizárható volt a vérkontamináció, mivel csak ezekben az esetekben találtunk alacsony albuminszint ( $x = 0,020 \pm 0,012$ ) mellett mindig emelkedett IgG ( $x = 1,533 \pm 0,278$ ) értékeket, ami a váladék gyulladós exsudatum jellegére utalt, szemben azokkal az esetekkel, ahol a szérumhoz hasonlóan, az albuminérték magasabb ( $x = 2,971 \pm 0,512$ ) volt, mint a globulin ( $x = 1,050 \pm 0,224$ ). Ezzel a megközelítéssel biztonsággal el tudtuk különíteni egymástól a vérrel szennyezett, vizsgálatra alkalmatlan ( $n = 34$ ), illetve a vérrel nem szennyezett, tehát tanulmányozható mintákat ( $n = 16$ ).

A lézer-nefelometriás vizsgálatra gyári reagensteket használtunk:

- IgG, IgM, C<sub>3</sub> (DAKO, Dánia)
- IgA, C<sub>4</sub>, CRP, albumin (Behring, Németország).

A citokin (IL-4, IL-10, IFN és TNF) mérések ELISA-módszerrel történtek (Amersham, U. K.).

Statisztikai feldolgozás során lineáris regressziós és korrelációs elemzést végeztünk, „SAS for Windows” számítógépes programmal ( $r$  = korrelációs együttható,  $p$  = valószínűségi érték). Az így készített statisztikai számítások során  $p < 0,05$  valószínűségi értéket tekintettük szignifikánsnak.

## Eredmények

A vérrel való szennyeződést kizáró kritériumok az 50 serosus otitisés fülváladékból 16 esetben adtak módot további vizsgálatokra. Az IgG értékek konzekvensen magasabbak, mint az albumin. Az IgG, IgA, IgM, C<sub>3</sub> és C<sub>4</sub> koncentrációk a lézer nefelometriával jól mérhető tartományban voltak. Ezzel szemben a CRP mérések során a 16 esetből csak egyszer kaptunk mérés határ fölötti eredményt. Ezért a CRP eredményeket a további statisztikai feldolgozásból kihagytuk. A CRP értékek mérés határ alatti szintje is azt bizonyítja, hogy a dobüregben zajló gyulladás már nem kezdeti akut stádiumban volt, hanem krónikussá vált folyamat alakult ki (1. táblázat).

Az IgG szint emelkedésével szignifikáns korrelációt mutatott az IgA emelkedése is, ami arra utal, hogy egymás mellett voltak a gyulladás során az IgG-t és a szekretoros IgA-t termelő B sejtek (1. A. ábra).

Az IgG és IgM szintek emelkedése lineárisan korrelált a két komplement fehérje, a C<sub>3</sub> és C<sub>4</sub> koncentrációjának emelkedésével, jelétül annak,

A dobüregi váladékban mért immunglobulinok, komplement faktorok, citokinek és akut fázis fehérje értékek (átlag és SE értékek)

Minta	Albumin g/l	IgG g/l	IgA g/l	IgM g/l	C <sub>3</sub> g/l	C <sub>4</sub> g/l	CRP g/l	IL-4 pg/ml	IL-10 pg/ml	IFN pg/ml	TNF pg/ml
1.	0,0202	0,218	0,075	0,042	0,044	0,016	0,0002	0,213	0,941	2,412	2,319
2.	0,007	1,57	0,27	0,295	0,275	0,048	0,0002	0,121	18,009	7,803	0,1
3.	0,0034	0,871	0,121	0,075	0,074	0,016	0,0002	0,719	0,506	7,803	2,319
4.	0,006	0,615	0,086	0,053	0,055	0,016	0,0002	0,595	1,203	5,712	3,18
5.	0,0053	1,668	0,477	0,229	0,088	0,023	0,0002	0,421	11,1	11,05	11,752
6.	0,187	0,933	0,286	0,07	0,044	0,021	0,0002	0,98	0,309	7,512	11,589
7.	0,0018	0,992	0,179	0,042	0,044	0,016	0,0002	0,75	0,309	3,051	1,486
8.	0,002	3,21	0,387	0,212	0,253	0,032	0,0006	0,126	2,426	4,625	3,18
9.	0,0021	1,219	0,209	0,072	0,049	0,016	0,0002	1,112	0,97	12,72	4,962
10.	0,0024	1,99	0,939	0,31	0,202	0,027	0,0002	0,98	0,562	11,228	25,842
11.	0,0029	0,581	0,309	0,051	0,044	0,016	0,0002	2,76	1,27	291,31	0,1
12.	0,0018	1,151	0,109	0,065	0,049	0,016	0,0002	4,512	0,876	3,12	0,1
13.	0,0021	1,074	0,113	0,053	0,044	0,016	0,0002	0,315	0,124	8,35	4,638
14.	0,011	4,737	0,957	0,101	0,148	0,035	0,0002	0,71	0,216	7,803	0,1
15.	0,0601	1,678	0,864	0,07	0,055	0,016	0,0002	3,2	0,721	4,213	4,7
16.	0,00531	2,019	0,178	0,111	0,097	0,016	0,0002	0,982	0,804	76,7	0,1
<b>Tiszta</b>											
x	0,020	1,533	0,347	0,116	0,098	0,022	0,00023	1,156	2,522	29,088	4,779
±SE	0,012	0,278	0,076	0,023	0,020	0,002	0,00003	0,311	1,224	18,030	1,679
Se.norm.	33.-52.	7.-16.	0.70-4.0	0.40-.30	0.90-.80	0.1-0.40	<5,0	0-24.18	0-18.7	<42	0-60.3

hogy a gyulladás során az immunglobulinokat termelő B sejtek mellett a komplement faktorokat termelő monociták és makrofágok is aktivált állapotban voltak (1. B-E. ábra).

Az IgM szintek emelkedése lineárisan korrelált a TNF és IL-10 koncentráció növekedésével, ami arra utal, hogy az immunglobulinokat termelő B sejtek mellett a citokinek termelő T sejtek is jelen voltak a gyulladásos nyálkahártyában (1. F-G. ábra).

Az IFN és TNF termelés fokozódásában is párhuzamosság volt megfigyelhető (1. H. ábra).

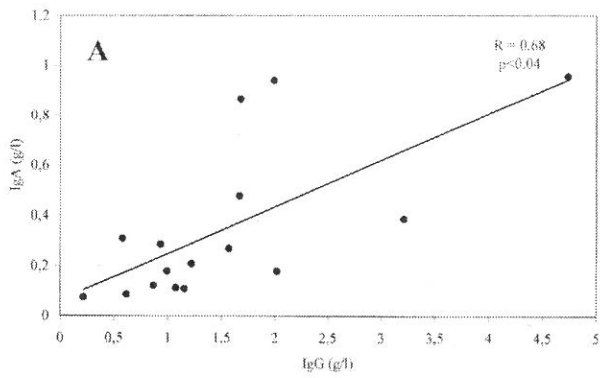
## Megbeszélés

Az OMCCS betegségben szenvedő gyermekek fülváladékában az IgG, IgA, IgM, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, IFN, TNF, IL-10 tartalom emelkedései egymással lineárisan korreláltak. Ezzel szemben az IL-4 és CRP mérések adatai nem voltak értékelhetők. A betegek szérumban az immunglobulin és komplement értékek normális tartományban voltak. Ezért a dobüregi váladékban az albumin mellett mért magas immunglobulin, komplement és citokin értékek lokálisan képződött, gyulladásos exsudatumnak tekintendők, nem a szérumból eredő transzudatumnak. Ezek alapján valószínű, hogy

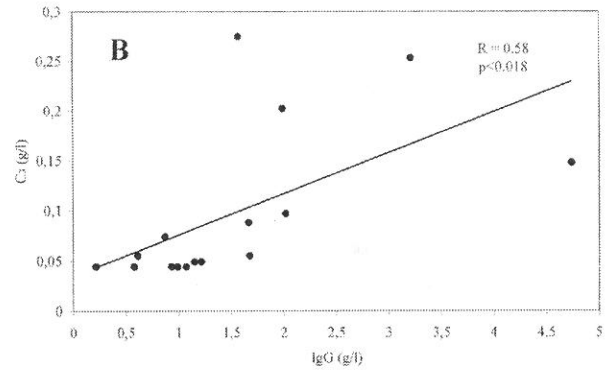
az immunglobulinokat a lokálisan jelenlévő B sejtek, a C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, TNF-t a monociták és/vagy makrofágok, az IFN-t a Th1, az IL-10-et a Th2 sejtek termelték (3, 5). Az immunglobulinok termelődése indirekt módon valamilyen helyileg perzisztáló infektiiv ágens, vagy annak lebomlási termékeinek jelenlétét bizonyítja (3).

Az elhúzódóan magas IgM koncentráció vírusfertőzés mellett szól. Ez egybehangzik azzal a megfigyeléssel, hogy a tubaszájadék körüli adenoidszövetben nagy mennyiségben mutathatók ki vírusok vagy vírus partikulumok. Ezek a dobüregbe jutva reinfekciót okoznak. Ezért van fontos szerepe az adenotómiának az OMCCS oki kezelésében (4, 9). A C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> és TNF emelkedés az aktív monocita/makrofág tevékenység jele. Figyelemre méltó ugyanakkor az, hogy a Th1 limfociták által termelt proinflammatorikus citokin – az IFN – mellett kimutatható a Th2 sejtműködésre jellemző IL-10 fokozott termelődése is. Ez utóbbi bizonyíthatja a gyulladás krónikus jellegét, mivel ismert, hogy az IL-10-nek van egy IFN hatást ellensúlyozó, a gyulladás kifejlődését gátló hatása is.

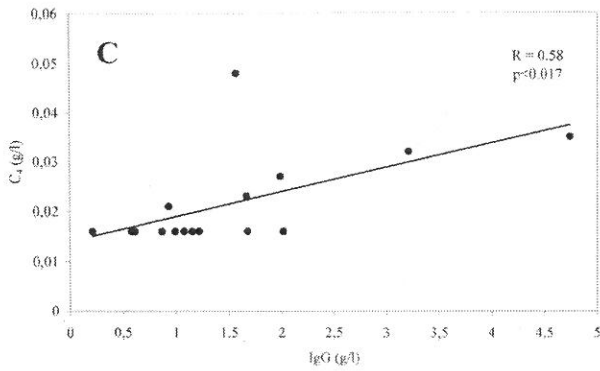
Vizsgálataink alátámasztják azt a korábbi megfigyelést, hogy az OMCCS tüneteinek fenntartásában az immunrendszer sejtjei által termelt immunglobulinoknak, komplement faktoroknak és



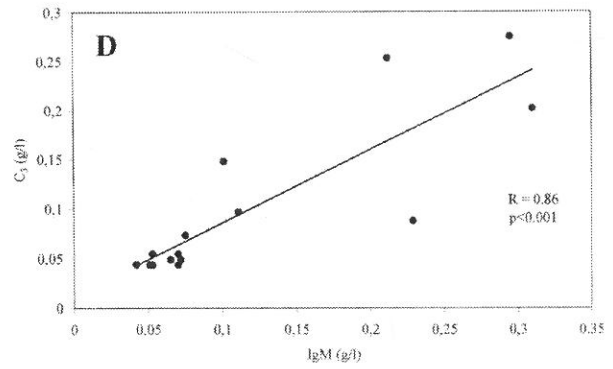
A: IgG – IgA



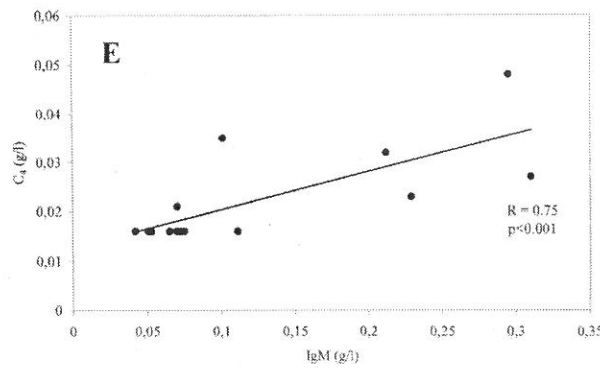
B: IgG – C<sub>3</sub>



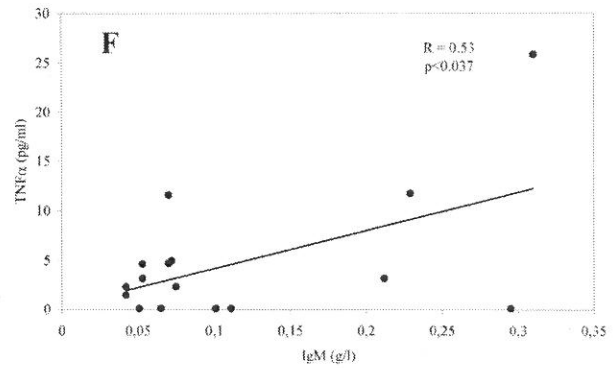
C: IgG – C<sub>4</sub>



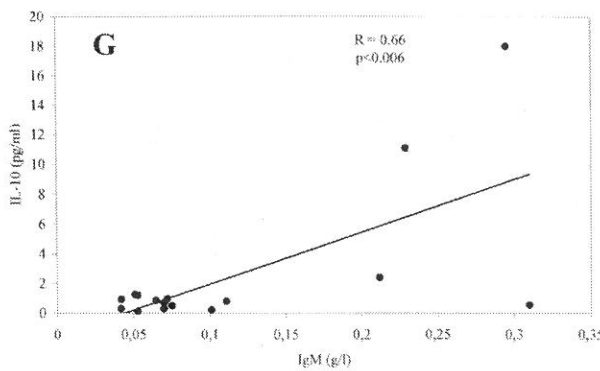
D: IgM – C<sub>3</sub>



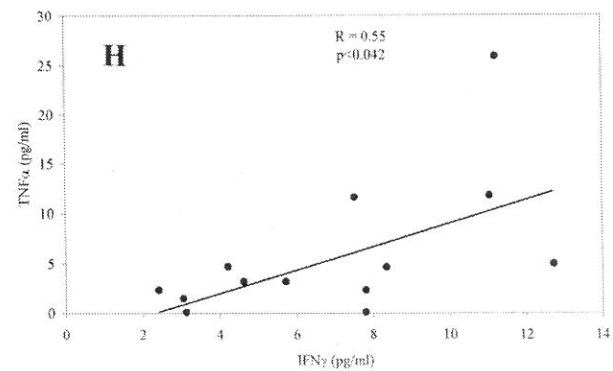
E: IgM – C<sub>4</sub>



F: IgM – TNF



G: IgM – IL10



H: IFN – TNF

1. ábra. Korreláció a dobüregi savós váladék immunglobulin, komplement és citokin tartalmai között

citokineknek patogenetikai jelentősége van. Eredményeink arra utalnak, hogy ezek a kóros fehérjék elsődlegesen a dobüregben, vagy annak környezetében akkumulálódó immunkompetens, a gyuladást fenntartó sejtek termékei. Elsőként mutatunk rá arra, hogy a dobüregi váladékban jelenlévő IL-10 szintjének emelkedése a folyamat krónikus jellegét bizonyíthatja. A mindkét T „helper” (Th1, Th2) sejttípus, a B sejtek és a monociták/makrofágok egyidejű jelenléte egyfajta szinergizmust feltételez a hatásukban az OMCCS fenntartásában. Ezen vizsgálatok folytatása segítséget nyújthat abban, hogy következtetni lehessen a dobüregi váladék serosus vagy mucosus jellegét meghatározó sejtek típusaira, továbbá a megfigyelt változások összefüggéseire a recidívák számával.

### Köszönetnyilvánítás

Ez a munka az ETT (003/1998), valamint az OTKA (T-025050) támogatásával készült. A szerzők köszönetüket fejezik ki Kulcsár Andreának a lézer nefelometriás mérésekért.

### Irodalom

- Berényi I., Jóri J.: Az otitis media exsudativa kórismézése és kezelése. *Fül-orr-gégégyógy.* **29**, 229–235, 1983.
- Bikhazi P., Ryan A. F.: Expression of immunoregulatory cytokines during acute and chronic middle ear immune response. *Laryngoscope (St.Louis)* **105**, 629–634, 1995.
- Falus A.: Az immunológia élettani és molekuláris alapjai. *Semmelweis Kiadó*, Budapest, 1996.
- Gates G. A.: Adenoidectomy for otitis media with effusion. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **103**, 54–57, 1994.
- Gergely J., Erdei A.: Immunbiológia. *Akadémiai Kiadó*, Budapest, 1999.
- Meri S., Lehtinen T., Palva T.: Complement in chronic secretory otitis media. *Arch. Otolaryngol.* **110**, 774–778, 1984.
- Narkiö-Makela M., Jero J., Meri S.: Complement activation and expression of membrane regulators in the middle ear mucosa in otitis media with effusion. *Clin. Exp. Immunol.* **116**, 401–409, 1999.
- Ogra P. L., Bernstein J. M., Yurchak A. M., Coppola P. R., Tomasi T. R.: Characteristics of secretory immune system in human middle ear: implication in otitis media. *J. Immunol.* **112**, 488–495, 1974.
- Pitkaranta A., Hayden F. G.: Respiratory viruses and acute otitis media. *N. Engl. J. Med.* **340**, 2001–2002, 1999.
- Thomas M. J., Kemeny D. M.: Novel CD4 and CD8 T-cell subsets. *Allergy* **53**, 1122–1132, 1998.
- Yellon R. F., Doyle W. J., Whiteside T. L., Diven W. F., March A. R., Fireman P.: Cytokines, immunoglobulins and bacterial pathogens in middle ear effusions. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* **121**, 865–869, 1995.
- Yellon R. F., Leonard G., Marucha P. T., Craven R., Carpenter R. J., Lehmann W. B., Burlison J. A., Kreutzer D. L.: Charac-

terisation of cytokines present in middle ear effusions. *Laryngoscope (St.Louis)*, **101**, 165–169, 1991.

### ZUSAMMENFASSUNG:

Verff. suchten die Zusammenhänge zwischen den Mengen der aus 50 Sekretproben von 31 ein- bis vierzehnjährigen Kindern mit chronischem serösem Mittelohrkatarrh (OMCCS) isolierten Eiweißen: Immunglobulinen (IgG, IgA, IgM), Komplement-Faktoren (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>), dem Akutphase-Eiweiß C-reaktives Protein(CRP) und einigen Cytokinen, dem Tumornekrose-Faktor Alpha (TNF), Gamma-Interferon (IFN), Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-10 (IL-10). Immunglobulin-, CRP- und Komplementuntersuchungen geschahen mit der Laser-Nefelometrie, die Zytokine wurden mit der ELISA-Methode bestimmt. Wegen der Kontamination mit Blut waren jedoch nur 16 Sekretproben von 13 Kindern für die Eiweißanalysen geeignet. Positive Korrelation wurde zwischen dem Anwachsen des Spiegels von IgG und IgA, IgG und C<sub>3</sub> gefunden. Mit der Erhöhung des IgM nahmen auch C<sub>3</sub> und C<sub>4</sub> zu. Eine signifikante Korrelation zwischen Cytokinen und Immunglobulinen konnte nur zwischen TNF und IgM sowie IL-10 und IgM festgestellt werden. Zur erhöhten Cytokin-Konzentration konnte ein signifikanter Zusammenhang nur zwischen TNF und IFN nachgewiesen werden. C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Spiegel nahmen parallel zu. Die Untersuchungen bestätigen frühere Teilbeobachtungen, die höhere Mengen von Immunglobulinen, Komplement und Cytokineiweißen im Paukenhöhlensekret bei OMCCS nachgewiesen hatten. Neu an den Ergebnissen ist die Erkenntnis, daß die erhöhte Produktion dieser Entzündungseiweiße in komplexer Form geschieht und nachgewiesen werden konnte. Die Erklärung dafür sind die bei OMCCS in der Paukenhöhle gemeinsam vorkommenden Zellen: die Immunglobulin-produzierenden B-Lymphozyten, die Komplement- und Cytokine-produzierenden Monozyten (Makrophagen) und die Cytokine-produzierenden T-Zellen.

**SCHLÜSSELWÖRTER:** Akutphase-Eiweiß, Cytokin, Paukenhöhlensekret, Immunglobulin, Komplement, Otitis media catarrhalis chronica serosa