

MH Egészségvédelmi Intézet Kóréletlani Kutató Osztály,
MH Központi Honvédkórház Traumatológiai Osztály*,
Országos Baleseti Intézet**,
Péterfy Sándor utcai Kórház, Traumatológiai Tanszék***

Mononukleáris sejtek citokin gén expressziójának vizsgálata multiplex traumában

Dr. Horkay Béla állatorvos-százados,

Dr. Nagy László*,

Dr. Fent János,

Dr. Pap Gábor**,

Dr. Mózes Tibor*** D.Sc.,

Dr. Fűrész József orvosezredes, Ph.D., egyetemi magántanár

Kulcsszavak: többszörös szöveti sérülés, multiplex trauma, in situ hibridizáció, gén expresszió, mRNS

A szerzők a specifikus immunrendszer működésében kulcsszerepet játszó T-helper limfocita alcsoportok (Th1/Th2) arányváltozásának szerepét tanulmányozták multiplex traumában. Balesetet szenvedett, többszörös szöveti sérülésen (multiplex trauma) átesett, betegeket (n=16) vizsgáltak a kórházba kerülés 1., 3., és 14. napján. A vizsgálatokat a T-helper limfocita előalakokra és alcsoportokra jellemző (T0A, T0B, Th1:IL-2, Th1:IFN- γ , T0B, Th2:IL-4, Th2:IL-10) citokin mRNS expresszió kimutatásával végezték. A beteg csoport citokin gén expressziós értékeit a kontroll csoport (n=7) medián értékeihez hasonlították. Eredményeik szerint a kórházi kezelés 1. napján az IL-10 mRNS értéke szignifikáns mértékben emelkedett, melyet a 3. napon az IL-2 gén expresszió szignifikáns emelkedése követett. A kórházi kezelés 3. napjára az IL-4 mRNS expresszió értéke is megemelkedett (20%), de a változás nem volt szignifikáns. Az IFN- γ mRNS expressziója egyik vizsgálati napon sem tért el lényeges mértékben a kontroll csoport mediánjától. A 14. napra valamennyi vizsgált citokin gén expressziója normalizálódott. Az a tény, hogy az IL-2 értékének növekedése az IFN- γ pozitív sejtek változatlan száma mellett következett be arra utal, hogy az IL-2 sejtek valószínűleg T0A, vagy T0B sejtek lehetnek. Az IL-10 pozitív sejtek jelentős emelkedése a Th2 sejtek számának növekedését jelezheti. Az IL-10 és IL-4 közötti eltérés jelzi, hogy a Th2 sejteken belül a citokin gén expresszió mértéke eltérő lehet.

A multiplex traumát követő sérülések után, a betegek egy jelentős részében a korszerű terápia – beleértve a profilaktikus antibiotikum kezelést is – ellenére szepszis, SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) és/vagy MODS (Multiple Organ Dysfunction Syndrome) alakul ki, amelyek a betegség mortalitását jelentősen fokozzák [6, 12].

A szöveti sérülés során felszabaduló illetve keletkező mediátorok a gyulladásos folyamat amplifikációja mellett jelentős hatást gyakorolnak a specifikus immunitásban kulcsszerepet játszó limfociták működésére [2, 9].

A T-helper limfociták funkcionális szempontból két egymással, szerepében, antagonistá hatású szubpopulációra oszthatók. A Th1/Th2 alcsoport által képzett citokinek egyrészt egymás termelésére hatva befolyásolják a két alcsoport arányát. Másrészt, alapjában modulálják a gyulladásos reakció lefolyását, illetve az immunrendszer működését. Az IL-10 elnyomja a Th1 limfociták és a makrofágok citokin termelését, továbbá szupresszálja az antigénspecifikus és a naiv limfociták proliferációját. Erőteljesen szupresszálja a monociták és makrofágok HLA-DR expresszióját. Immunszupresszív hatása mellett az IL-10 stimulálja a B-limfociták proliferációját és az aktivált B-sejtek immunglobulin alosztály szerinti differenciáltságát [2, 4, 9, 17]. Az IL-2 gén expressziójában a szöveti sérülést követő első 24 órán belül erőteljes csökkenést mutattak ki [1]. Az IFN- γ , mint gyulladásos citokin fokozza, az MHC molekulák és a sejtfelszíni adhéziós faktorok expresszióját, az IL-

1, a TNF α és a kemokinek termelését. Az IL-4 az immunglobulin alosztályok IgE irányába történő izotípus váltását és a humorális immunválaszt szabályozza, a Th2 és B limfociták növekedési faktora, amely elnyomja a makrofágok antigén prezentációját.

Vizsgáltuk a betegség lezajlásának kinetikáját, mivel az irodalom szerint eddig még nem végeztek követéses vizsgálatot. Választ kerestünk arra a kérdésre is, hogy multiplex traumában miként változik az IL-10 és az IFN- γ gén expresszió egymáshoz viszonyított aránya. *In situ* hibridizációval (ISH) tanulmányoztuk az alcsoportokra jellemző, multiplex traumát követő citokin gén expressziót változásokat és a Th1/Th2 arány módosulását.

Anyagok és módszerek

Vizsgálati csoportok

16 középsúlyos multiplex traumát szenvedett beteget (12 férfi és 4 nő, átlag életkoruk: 43,5 év) vizsgáltunk a kórházba kerülés 1., 3., és 14. napján. A beválogatás feltétele volt a klinikai állapotot mutató score-k megállapítása (ISS>20, APACHE-II >9, <16). A kizárás kritériumai, miszerint a beteg nem kaphatott transzfúziót, gyulladást csökkentő kezelést és antibiotikum kezelést. Az égetteket szintén nem válogattuk be a beteg csoportba.

A kontroll csoportot 7 egészséges önkéntes donor (4 férfi, 3 nő, átlag-életkor:32,4 év) alkotta.

Vérminta

A vizsgálatokhoz a betegcsoportnál a centrális vénából, a kontroll cso-

| Antisence próba oligonukleotid | Szekvencia |
|--------------------------------|--|
| IL-2 | 5'>AgC TAA ATT TAG CAC TTC CTC CAg < 3' |
| IL-4 | 5'> AgC TgC TTg TgC CTg Tgg AAC TgC TgT gCAgTC gCA CCC Agg CAg CgA gTg TCCT < 3' |
| IL-10 | 5'> CAC CTg CTC CAC ggC CTT gCT CTT gTT TTC ACA ggg AAg AAA TCg ATg ACA gCgC < 3' |
| IFN- γ | 5'> gAg TTC CAT TAT CCg CTA CAT CTg AAT gAC CTg CAT TAA AAT ATT TCT TAAgg < 3' |

I. táblázat: Szintetikus oligonukleotidok bázissorrendje

portnál a kubitális vénából, steril vákuum csőbe (Greiner) vett, 10 ml, 3,8 g% Na-citráttal alvadásban gátolt vért használtunk.

Mononukleáris sejtek szeparálása

A mononukleáris sejteket (MNC) Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Svédország) grádiensen (20°C-on 1000 g, 30 perc) szeparáltuk. A sejteket Parker médiumban (5-5 ml) kétszer mostuk, (10 perc, 400 g, 200°C. A sejtek viabilitásának meghatározása után a sejtszámot 10⁵ sejt/ml-re állítottuk be.

Áramlási citometria

A sejt szeparálás eredményességét áramlási citometriával elemeztük. A betegek alvadásban gátolt teljes véreből és a szeparált mononukleáris sejtrétegből fixálás után, kettős ill. hármas festéssel a következő felületi markereket jelöltük CD45/14, CD2/19, CD3/16+56, CD4/8/3.

In situ hibridizáció (ISH) preparátum készítése

A sejtszuspenziók 50-50 ml-ét szilánózott tárgylemezre (Oncor Inc., Gaithersburg, USA) cseppentettük,

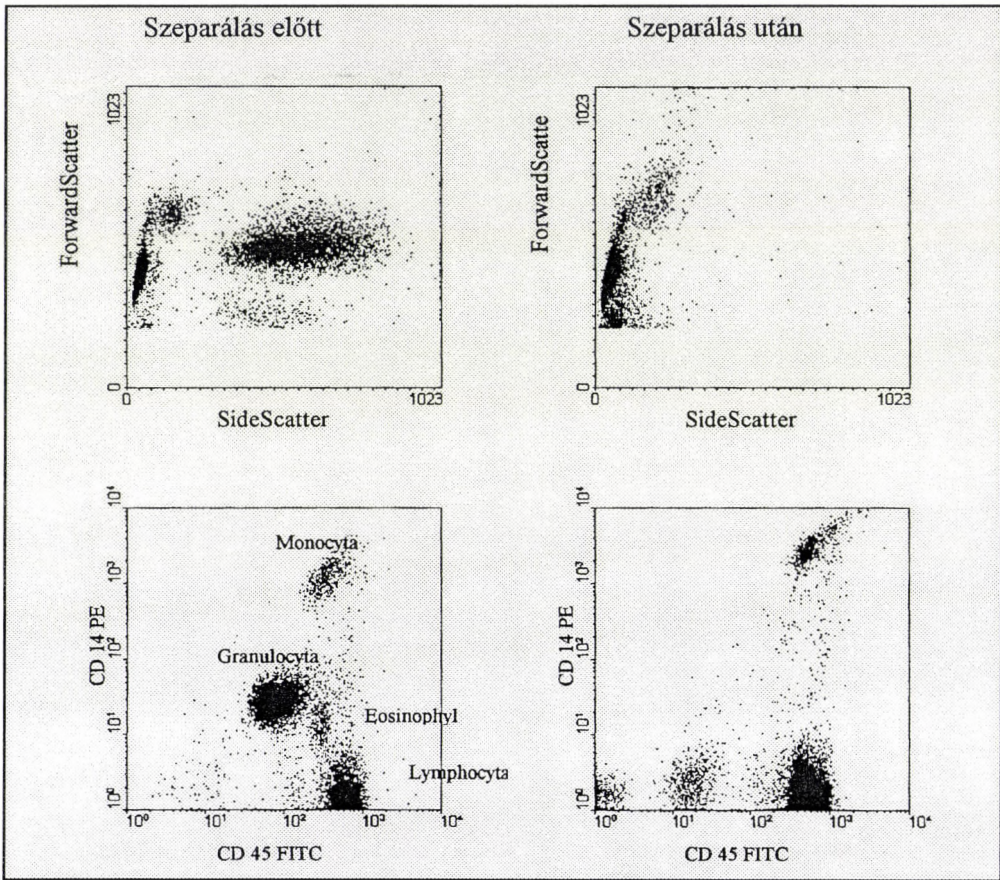
majd a sejteket a lemezek felületére szárítottuk (45°C, 15 perc) és puffertolt 4%-os formaldehiddel a felületre fixáltuk (20°C, 10 perc). A fixálást követően a sejteket 1-2 percig 0,1% pepszinnel (Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) 38°C-on emésztettük. Megismételtük a fixálást és a preparátumokat 50-75-96%-os alkoholsoron (Reanal, Budapest, Magyarország), 10 percen keresztül 20°C-on víztelenítettük.

ISH próbák

A szintetikus IFN γ , IL-4, IL-10 és IL-2 mRNS oligonukleotid próbák tervezését az Európai Molekuláris Biológiai Hálózat (EMBNET) felhasználásával végeztük. A próbák ellenőrzésekor mind a négy kiválasztott próbára (I. táblázat) 100%-os identitási eredményt kaptunk. A próbákat fotobiotinnal (Vector Laboratories, Inc., Bulingame, USA) „random primed” módon jelöltük.

In situ hibridizáció

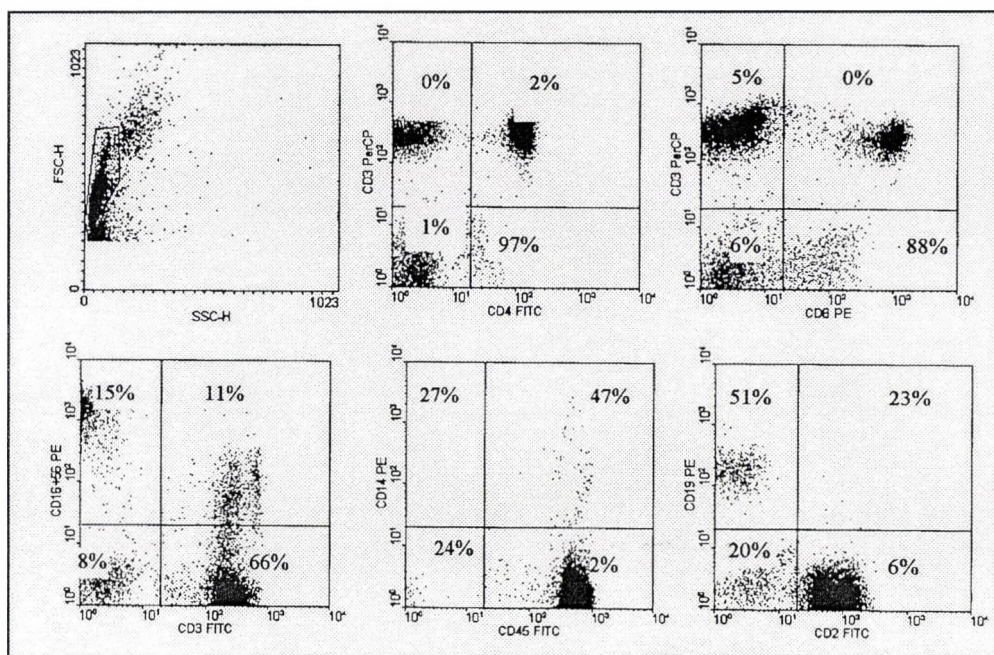
Felhasználás előtt a lemezeket PBS, pH: 7,4 pufferrel rehidráltuk. Az ISH készülék (Grant Boekel, Cambridge, Nagy-Britannia) nedves kamráit



1. ábra: A szeparálás eredményességét bemutató flow citometriás mérési eredmény

+37⁰C-ra melegítettük. A preparátumokra mértük a 8 ng/ml-re beállított próbák 20-20 nl munkahígítását. Minden mérésnél negatív kontrollt alkalmazunk, ahol a próba DNS helyett csak hibridizációs puffert (20xSSC, 100x Denhard's, 10 mg/ml lazac DNS) (Pharmacia, Uppsala, Svédország) használtunk. A hibridizáció (+40⁰C) 8 órán keresztül tartott, majd a rendszer visszatért szobahőre (+20⁰C). A lemezeket steril BN pufferben (0,1M Na-bicarbonát, 0,05% Nonidet P-40) (Vector Laboratories, Inc., Bulingame, U.S.A.), steril 2xSSC-ben és steril SSC+0,5% Triton-x ol-

datban 3-3 percig mostuk. Közben a gép kamráit visszaállítottuk +37⁰C-ra. Szobahőn történő szárítás után a lemezeket nedves kamrába helyeztük és minden minta felszínére 20-20 nl normál kecskeszérumot (HUMAN RT, Gödöllő, Magyarország) csepeztünk, amellyel 10 percig inkubáltuk a preparátumokat. A nem specifikus kötőhelyek lefedése után a lemezeket +37⁰C-os BN pufferrel mostuk, és száradás után visszahelyeztük a kamrákba. A következő lépésben 20-20 nl alkalikus foszfatázzal jelölt streptavidin oldatot (Vector Laboratories Inc., Bulingame, USA)



2. ábra: *Lymphocytá kapun belüli flow citometriás mérési eredmény*

cseppentettünk a preparátumokra. A $+37^{\circ}\text{C}$ -on zajló inkubáció 20 percig tartott. A reakció végén megismételtük a BN pufferes mosást. A kamrákba visszahelyezett lemezekre BCIP/NBT oldatot (Vector Laboratories Inc., Bulingame, USA) cseppentettük és a mintákat újabb 20 percig inkubáltuk. A reakcióidő eltelte után a készítményeket csapvízzel, majd desztillált vízzel mostuk. Ezután a preparátumokat 1%-os metilzölddel (Merck, Darmstadt, Németország) kontrasztfestettük (2 perc). A lemezeket kétszeres desztillált vízzel történő öblítés után megszáritottuk és mounting médiummal (Dako A/S, Koppenhága, Dánia) fedtük. Fénymikroszkóp (Olympus Optical CO, Hamburg, Németország) negyvenszeres objektív nagyításával meghatároztuk a formazán pozitív sejtek százalékos arányát.

Statistikai értékelés

A beteg csoport 1., 3., 14. napi eredményeinek mediánját hasonlítottuk a kontroll csoport citokin mRNS medián értékeihez. A statisztikai analízist *Mann-Whitney* teszttel végeztük.

Eredmények

Aramlási citometria

Az *in situ* hibridizációt megelőző sejtzisolálás révén a fehérvérsejt szuszpenzióból sikerült 93-95 % tisztaságú a mononukleáris sejtpopulációt elkülöníteni. A mononukleáris sejteken belül 4 %-ban monociták és 89 %-ban limfociták voltak kimutathatók. A limfocitáknak csak mintegy 5 %-a bizonyult B limfocitának. Az 1. és 2. ábra valamint a II. és III. táblázat egy reprezentatív mérési eredményét mutatja be.

| | PERIFÉRIA % | SZEPARÁLT % |
|------------------|----------------|----------------|
| Lymphocita kapu | 35 | 86 |
| Monocyta kapu | 4 | 4 |
| Granulocyta kapu | 56 | 0 |
| Törmelék kapu | 1 | 7 |

| | PERIFÉRIA % | SZEPARÁLT % |
|-----|----------------|----------------|
| Th% | 46 | 47 |
| Tc% | 20 | 22 |
| NK% | 14 | 15 |
| B% | 6 | 5 |

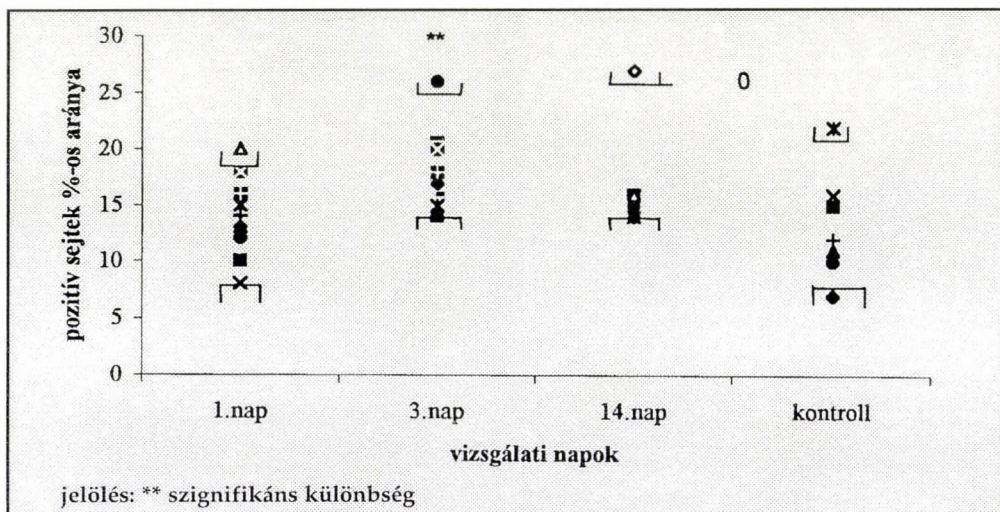
CD4/CD8 arány 2,25 ill. 2,14

II. táblázat:

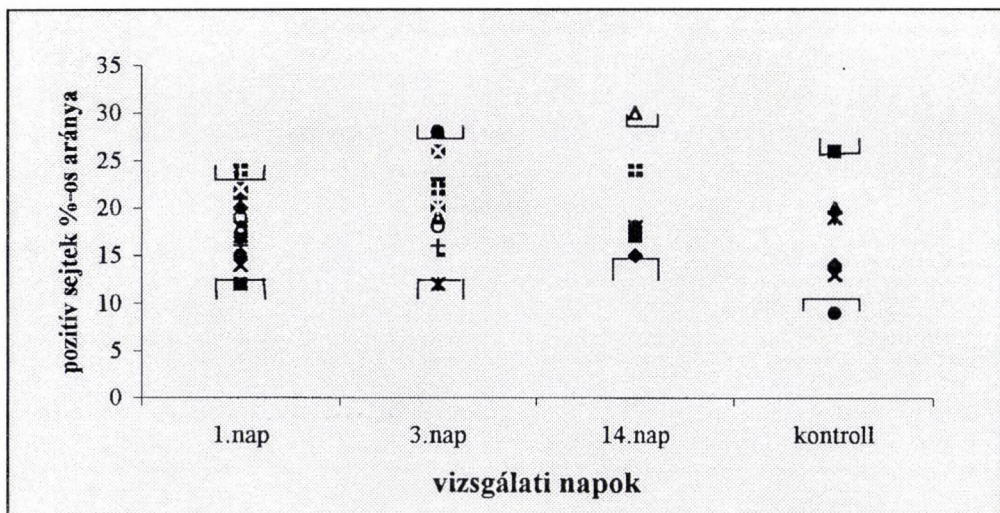
Flow citometriás mérési eredmények számszerű értékei

III. táblázat:

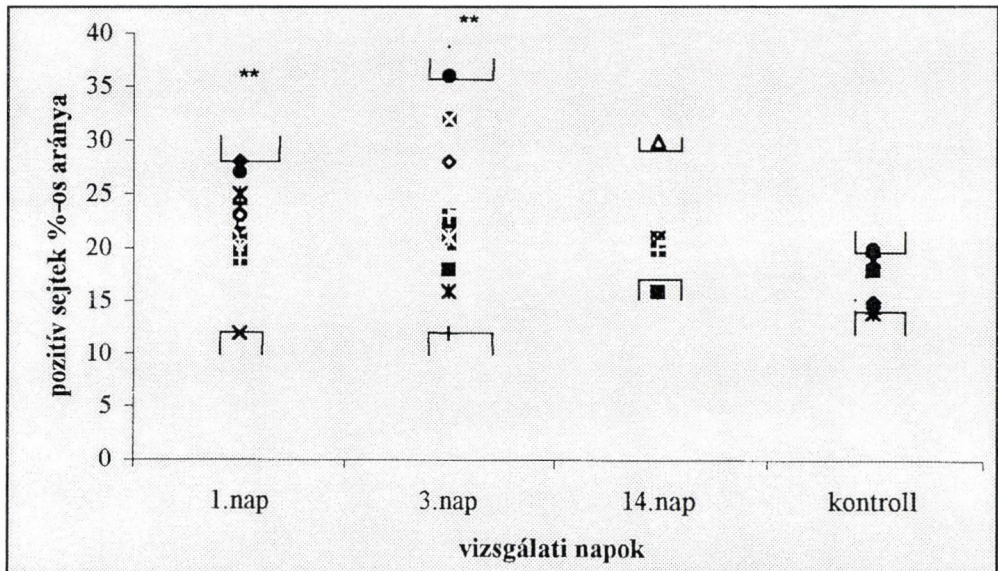
Lymphocyta kapun belüli változás



3. ábra: IL-2 mRNA expresszió multiplex traumában



4. ábra: IL-4 mRNA expresszió multiplex traumában



5. ábra: IL-10 mRNA expresszió multiplex traumában

ISH

Az IL-2 mRNA-re pozitív sejtek százalékos értékeit a 3. ábrán foglaltuk össze. Az azonos jelölések az azonos személyek adatait jelentik. A medián eredményeket összehasonlítva megállapítható, hogy a balesetet követő 1. napon az IL-2 gén expresszió medián értéke nem változott, de a 3. napra szignifikánsan ($p < 0,05$) megemelkedett ($18 \pm 3,3\%$ vs. $13 \pm 4,9\%$), a 14. napra pedig visszatért a kontroll csoport átlagához.

Az IL-4 mRNA expressziót vizsgálva megállapítható, hogy bár a medián értékek a kontrollhoz ($16,5\%$) viszonyítva kissé emelkedtek (18% , 20% illetve 18%), de a változás egyik vizsgálati napon sem volt szignifikáns (4. ábra).

Az IL-10 mRNA expressziót mutató sejtek %-os értékei a kontrollhoz (18%) viszonyítva már az első (22%) és a

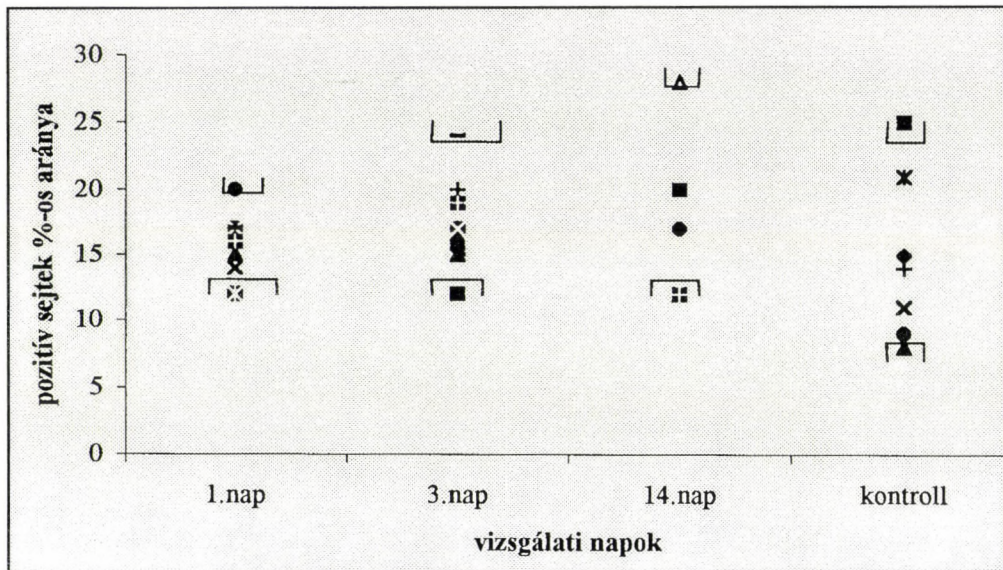
harmadik (22%) napon is szignifikánsan ($p < 0,05$) magasabb értékeket értek el. A 14. napra azonban az IL-10 mRNA expresszió csökkent (20%) és a szignifikáns különbség ($p = 0,07$) megszűnt (5. ábra).

Az IFN- γ gén expressziót mutató sejtek aránya a kontrollhoz (14%) viszonyítva az egyes vizsgálati napokon magasabbnak bizonyultak ($17-17-17\%$), de a különbség nem volt szignifikáns (6. ábra).

Értékelés

A súlyos szöveti sérülés során az aspecifikus immunrendszer aktiválódása és a specifikus immunrendszer zavara figyelhető meg. Az immunrendszer funkcionális zavara és a betegség szövődésményei között számos szerző jelentős korrelációt mutatott ki [2, 3, 4, 9].

A specifikus immunitás szabályozásában döntő jelentőségű a T-helper se-



6. ábra: *IFN-gamma* mRNS expresszió multiplex traumában

itek érési dichotomiája. Ismertté vált ugyanis, hogy a keringésben és a szövetekben a T-helper sejtek, a döntő módon humorális immunválaszt reguláló Th2 és a döntő módon sejtes immunválaszt reguláló Th1 sejtekké alakulnak. A Th1 és Th2 sejtek a termelt citokinek típusa alapján viszonylag jól jellemezhetők. A Th1 irányba elkötelezett sejtekre az IFN- γ , IL-2 míg a Th2 irányba elkötelezett sejtekre az IL-10, IL-4 termelését tartják jellemzőnek [6, 9]

Jelen vizsgálatunk során a Th2 citokinek mRNS-ére pozitív sejtek %-os arányának megnövekedését tapasztaltuk. Érdekes, hogy az egyes Th2 citokin gének expressziója időben eltolódva jelentek meg. Az IL-10 gén expressziót mutató sejtek aránya már a balesetet követő 1. napon jelentősen megemelkedett. Az IL-10 mRNS pozitív sejtek aránya a 3. napon tovább-

ra is szignifikánsan emelkedett maradt. Az IL-10 az IFN- γ , az IL-1, az IL-2 az IL-6 és a TNF- α termelését jelentősen gátolja, így az IL-10 gén expresszió korai fokozódásának jelentős szerepe lehet a szöveti sérülést követő gyulladásos reakció szabályozásában. [6, 14, 15]. Ugyanakkor az IL-10 az IFN- γ termelés gátlásával jelentősen hozzájárul a Th2 sejtvonal túlsúlyának kialakulásához.

Az IL-10 mellett a Th2 sejtekre jellemző IL-4 gén expressziót mutató sejtek aránya a vizsgálat során csak enyhén emelkedett. Hasonló eredményt kaptak *L. Bromly* és munkatársai is [7], akik az IL-4 mRNS szintézisét a gyulladásos betegségekben szenvedő betegekben alacsony szintűnek találták.

A Th2 sejtekre egyaránt jellemző citokinek génjeinek eltérő expresszióját kétféleképpen is magyarázni lehet. Egyrészt ez az adat azt látszik

alátámasztani, hogy a Th2 sejtekre jellemző citokinek génjeinek expresszivitása kinetikájában eltér, másrésztől jelentheti azt, hogy a Th2 sejtek mellett nagyszámban jelenhetnek meg csak IL-10 gén expressziót mutató egyéb mononukleáris sejtek is.

Jelen vizsgálatunkkal az IFN- γ gén expressziót mutató sejtek arányában szignifikáns emelkedést nem tudtunk kimutatni, ellentétben *W. Ertel* és munkatársai [10] vizsgálatával, akik multiplex traumát követően az IFN- γ mRNS expressziójának emelkedéséről számolnak be. A két eredmény közötti eltérést magyarázhatja, hogy *W. Ertel* és kollégái a citokinek mennyiségét, míg munkacsoportunk a mRNS pozitív sejtek százalékos arányát határozták meg. Hasonló lehet a magyarázata annak a különbségnek is amely az IL-4 és az IFN- γ potenciális antagonizmusát illeti. Vizsgálatunk alapján ugyanis az IL-4 (és az IL-10) pozitív sejtek arányának növekedését nem követte az IFN- γ gén expressziót mutató sejtek arányának csökkenése. *E. Abraham* és munkatársai [1] ugyanakkor flow citometriás technikát alkalmazva a két citokin gén expresszivitása között kísérleti állatokon a sérülés első napján erőteljes és kétirányú antagonizmust mutattak ki.

A citokin gének expressziója a harmadik napon volt a legmarkánsabb. Ezen eredmények jól korrelálnak azokkal a megfigyelésekkel [2, 3, 9, 11] amelyek szerint a 3–5. napra esik a szervezet válaszreakciójának teljessé válása.

A vizsgálat tizennegyedik napjára a vizsgált beteg csoport mRNS átlagértékei az IL-10 expressziót kivéve viszatértek a kontroll csoport medián értékeihez. Amely eredménnyel a betegek gyorsan javuló klinikai állapota összhangban volt.

Összegezve megállapíthatjuk, hogy a traumás szöveti sérülés az immunrendszer sejtjes eleminek korai, jelentős aktiválódását okozza. A mRNS expresszió változása a multiplex trauma klinikai lefolyásával párhuzamosan változott. A legnagyobb aktivációt az 1. és a 3. vizsgálati napon tudtuk kimutatni.

IRODALOM

- [1] *Abraham, E., et al.*: Hemorrhage produces abnormalities in lymphocyte function and lymphokine generation. *J. Immunol.*, 1989, 142: 899-906.
- [2] *Aguliar, M. M. et al.*: Posttraumatic lymphocyte response: a comparison between peripheral blood T cells and tissue T cells. *J. Trauma*, 1998, 45: 14-18.
- [3] *Barak, V. et al.*: Prevalence of hypophosphatemia in sepsis and infection: The role of cytokines. *The Am. J. of Medicine*, 1998, 104: 40-47.
- [4] *Bitterman, H. et al.*: Acute release of cytokines is proportional to tissue injury induced by surgical trauma and shock in rats. *J. Clin. Immunol.*, 1991, 11: 184-192.
- [5] *Bone, R. C.*: Toward an epidemiology and natural history of SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) *JAMA*, 1992, 268: 3452-3455.
- [6] *Bone, R. C.*: Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: What we do and do not

- know about cytokine regulation. *Crit. Care Med.*, 1996, 24: 163-172.
- [7] *Bronley, L. et al.*: Non-isotopic detection of mRNA for interleukin-4 in archival tissue. *J. Immun. Methods*, 1994, 167: 47-54
- [8] *Chang E. A. et al.*: Haemorrhage-induced alterations in function and cytokine production of T cells and T cell subpopulations. *Clin. Exp. Immunol.*, 1992, 90: 497-502.
- [9] *Cheadle G.C. et al.*: Lymphocyte subset responses to trauma and sepsis. *J. Trauma*, 1993, 35: 844-849.
- [10] *Ertel W. et al.*: Interferon- γ attenuates hemorrhage-induced suppression of macrophage and splenocyte functions and decreases susceptibility to sepsis. *Surgery*, 1992, 177-186.
- [11] *Finch, R.G.*: Design of clinical trials in sepsis: problems and pitfalls. *Antimicrobial Chemotherapy*, 1998, 41, Suppl. A.: 95-102.
- [12] *Goris R. J., et al.*: Multiple organ failure. *Arch. Surg.*, 1985, 120: 1109-1115.
- [13] *Jaspert, B.*: Detection of intracellular mRNA by in situ hybridization with digoxigenin labeled cRNA probe. *Immunology Methods Manual*, 1997, Academic Press Ltd, 1238-1243.
- [14] *Marie C., et al.*: Cytokines and soluble cytokine receptors in pleural effusions from septic and nonseptic patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1997, 156: 1515-1522.
- [15] *Ralph, P., et al.*: IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.*, 1992, 148: 808-814.
- [16] *Schmand, J.F. et al.*: Effects of trauma, duration of hypotension, and resuscitation regimen on cellular immunity after hemorrhagic shock. *Critical Care Medicine*, 1994, 22: 1076-1083.
- [17] *Waydhas C. et al.*: Inflammatory mediators, infection, sepsis, and Multiple Organ Failure after severe trauma. *Arch. Surg.* 1992, 127: 460-467.

Capt. B. Horkay M.D.M.C.,
L. Nagy M.D.,
J. Fent M.D.,
G. Pap M.D.,
T. Mózes M.D., D.Sc.,
Col. J. Fűrész M.D.M.C., Ph.D.

Cytokine gene expression in mononuclear cells in multiplex trauma

The cytokine gene expression characteristic to the T-helper lymphocyte ratio in patients suffering from multiplex trauma was investigated on the 1th, 3rd and 14th days of admission. The patient group consisted of 12 men and 4 women. In situ hybridisation was performed with IL-2, IL-10, IL-4, INF- γ probes labelled with photobiotin. Averages and standard deviations were calculated by groups and by days of investigation. Data of the patient group were compared to the those of the control group (n=7). On the 1st days of hospitalisation the mRNA expressions of IL-10 was significantly higher (p<0.05) than that of the control group. The gene expression of IL-4 and IL-2 were not elevated on the 1st day, but IL-2 was significantly on the 3rd day after the admission (p<0.05) The average of INF- γ gene expression was above not significantly (p>0.05) the control levels, however it was not significantly elevated and decreased to control values by the 3rd day. On the 14th day no significant differences could be found in the gene expression of either cytokine. Changes found in the cytokine gene expression of T-lymphocytes during multiplex trauma emphasise a change in the ratio and also in the activity of front groups and subpopulations Th1/Th2.

Dr. Horkay Béla á.o. szds.
 1555 Budapest, Pf. 68.