

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A STAPES FIXÁCIÓK ETIOPATHOGENEZISÉNEK
VIZSGÁLATA**

Csomor Péter



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2012.

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
BEVEZETÉS	4
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
Szervspecifitás és kórszövettan: miért csak az emberi capsula otica érintett?	6
Az otosclerosis genetikai háttere	10
A kanyaróvírus és receptorának (CD46) szerepe az otosclerosis etiopathogenezisében	12
Autoimmunitás és gyulladás	15
Hormonális és metabolikus tényezők	18
Az otosclerosis nem-sebészeti kezelése - terápiás megfontolások	22
Célkitűzések	25
METODIKÁK	27
Betegek	27
Szövettani vizsgálatok	29
Nukleinsav extrakció és a kanyaróvírus genom kimutatása RT-PCR technikával	30
CD46 variánsok kimutatása RT-PCR technikával	32
CD46 amplimerek tisztítása poliakrilamid gélből	35
az elkülönített cd46 variánsok restrikciós analízise	35
kanyaróvírus- specifikus ELISA	38
TNF- α receptor I/II- specifikus immunofluoreszcens vizsgálatok (IFA)	38
hCIAP1/2 és Granzyme B- specifikus immunofluoreszcens vizsgálatok (IFA)	40
EREDMÉNYEK	44
Az otosclerosishoz kapcsolható CD46 izoformák restrikciós analízise	44
TNF-alfa receptor I/II expressziós sajátosságainak vizsgálata	49
Apoptózis markerek vizsgálata	53
A kísérletes munkában részt vevő társszerzők munkájának ismertetése	61
MEGBESZÉLÉS	64
ÖSSZEFOGLALÁS	72
SUMMARY	73
ÚJ MEGFIGYELÉSEK	74
IRODALOMJEGYZÉK	75
TÁRGYSZAVAK	95

KEYWORDS	95
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	96
FÜGGELÉK	97

BEVEZETÉS

Jelen dolgozat a stapes fixációk etiopathogenezisének vizsgálatával foglalkozik, elsősorban az otosclerosis kialakulására koncentrálva, emellett persze kitérve az otosclerosis és a nem-otosclerosis stapes fixációk közötti klinikai-, kórszövettani- és molekuláris biológiai különbségekre is. Mint ahogy azt a későbbiekben is látni fogjuk, az otosclerosis etiopathogenezise nagymértékben eltér a többi stapes fixációtól, és jelenleg sem teljesen tisztázott, ebből következően több eltérő elmélettel próbálják magyarázni.

Az otosclerosis az emberi belsőfül csontos tokjának (capsula otica) csontátépülési zavara. A betegség a stapes talp ovális ablakhoz történő rögzülésével, és a cochlea csontos részében végbemenő endostealis osteolysissal, újcsontképződéssel jár. A kóros csontképződéssel párhuzamosan, klinikailag progresszív vezetékes- és/vagy szenzorineurális halláscsökkenés alakul ki, melyet szédülésszerű panaszok (vertigo, „dizziness”) és fülzúgás (tinnitus) kísérnek. A kaukázusi fehér populációban a stapes fixáció (amelyet korábban klinikai otosclerosisként említettek) prevalenciája 0,3-0,4%-ra tehető. Ugyanebben a populációban a halláscsökkenések között 5-9%-os, a vezetékes halláscsökkenésben szenvedők között pedig 18-22%-os prevalenciát mutat (1,2,3). Az otosclerosis nagyon ritkán jelenik meg az afrikai feketék, és az ázsiaiak között (0,03-0,1%), miközben az északi (Európa, Amerika) fehér populációban lényegesen gyakoribb, így elmondható, hogy a betegség előfordulási gyakorisága jellegzetes földrajzi és populációs sajátosságokkal bír (1,3). Ezek a epidemiológiai adatok csak a stapes fixációk összességére vonatkozóan helytállóak, a nem-otosclerosis stapes fixációk esetében már nem érvényesek (3,4). A teljes fehér populációnak kevesebb, mint 0,5%-ban okoz az otosclerosis klinikai tüneteket, ezzel szemben az úgynevezett „néma” otosclerosisos góccok sokkal gyakoribbak. Nagyszámú, nem szelektált boncolási adat alapján a temporális csontok 8-11%-ában volt észlelhető a klinikai tünetekkel nem kísért szövettani otosclerosis (3).

Az otosclerosis jellemzően kétoldali progresszív halláscsökkenéssel járó megbetegedés, melynél a halláscsökkenés mértékében, és időbeli lefolyásában komoly eltérések lehetnek a két fül között. Az esetek többségében 30-50 éves kor között jelentkezik a halláscsökkenés, de az ettől tapasztalt pozitív, vagy negatív irányú eltérések az otosclerosist nem zárják ki. Azt a tényt, hogy 14 éves kor alatt klinikai tüneteket okozó otosclerosis nem

alakul ki, külön ki kell emelnünk. Az otosclerosis 2-3-szor gyakrabban fordul elő a nők körében, mint a férfiaknál, ez hormonális hatásokat feltételez. A már kialakult otosclerosis progresszióját kezdetben fokozhatják a magasabb ösztrogén és progeszteron szintekkel jellemezhető állapotok (terhesség, orális antikonceptívumok szedése, menstruáció ovulációs fázisa, ovuláció indukciós kezelés stb.) (3).

Az otosclerosisnak jelenleg nincs ismert állatmodellje, amely a betegség szervspecifitásának tudható be. Az otosclerosis szervspecifitást mutat az emberi belsőfül csontos tokja (*capsula otica*) iránt, hiszen a csontremodellációs zavar során megjelenő otosclerosisos göcök kizárólag a temporális csontban figyelhetők meg, a szervezet más csontjaiban a nem találhatóak ilyen csontléziók (2). A *capsula otica*-ban és a stapes talpban a születést követően megkezdődő enchondrális csontosodás általában egy éves korig be is fejeződik (1,4,5). Ha a *capsula otica* egyszer elmeszesedett, akkor ezek után már nem mutat érdemi remodellációt. Az átépülés szinte teljes hiánya figyelhető meg a perilymphaticus térrel szomszédos csontrétegben (5,6). Fiziológiás körülmények között a normális csontátépülés az osteoclastok és osteoblastok jól kontrollált metabolikus aktivitásának eredménye, de ez a folyamat szinte sosem figyelhető meg a felnőtt *capsula otica*-ban (5,6). Ezt az a tény is alátámasztja, hogy a *capsula otica*-ban normális körülmények között sem osteoclastok, sem osteoblastok nem mutathatóak ki és prekursor alakjaik is teljesen inaktívak. Ez a nyugalmi állapot erős traumák hatására sem változik meg, mivel a temporális csontban bekövetkezett töréseket követően nem képződik valódi csontos callus (5). Az emberi belsőfül csontos tokját három csontszerű réteg alkotja, ezek a következők: a perilymphaticus tér közvetlen szomszédságában az *endostealis* réteg, a középen elhelyezkedő *globuli interossei*, amely embryonalis porcmaradványként fogható fel, valamint a külső *periostealis* réteg (5). Az eddigi megfigyelések alapján valószínűsíthető, hogy az otosclerosisos göcök kialakulásának predilekciós helyét a *globuli interossei* tartalmazó középső embryonalis réteg alkotja (1,3,4,5,6).

Az elmúlt hat évtizedben (1947-2009) megjelent közlemények közül a PubMed elektronikus adatbázisában megtalálható 4745 közlemény foglalkozik az otosclerosis patológiájával, gyógyszeres-és sebészi kezelésével. Ezek közül 1593 tanulmány jelent meg az elmúlt 25 évben, amelyek közül csupán 98 közlemény közölt adatokat a betegség etiopathogenezisére vonatkozóan, ezen belül is csak 31 olyan dolgozat található, amelyeknél az otosclerosis diagnózisa kórszövettanilag is igazolt volt. Ennek tükrében érthető, hogy az utóbbi néhány évtized intenzív klinikai és laboratóriumi kutatómunkájának ellenére a betegség etiopathogenezise miért maradhatott tisztázatlan.

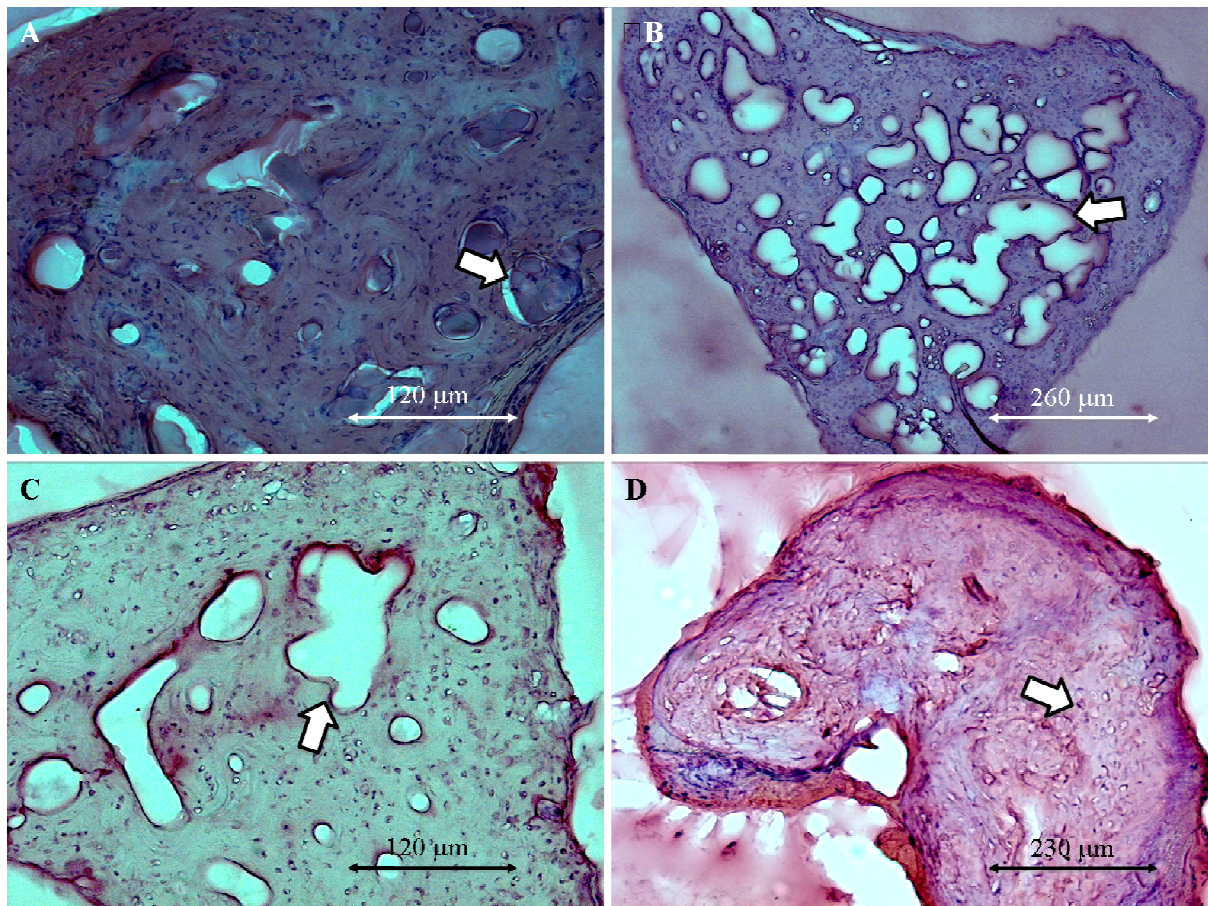
IRODALMI ÁTTEKINTÉS

SZERVSPECIFITÁS ÉS KÓRSZÖVETTAN: MIÉRT CSAK AZ EMBERI CAPSULA OTICA ÉRINTETT?

Az otosclerosis kórszövettani sajátosságai

Az otosclerosis kórszövettani sajátosságait már a XIX. századtól kezdődően részletesen tanulmányozták. Az otosclerosisra leginkább jellemző szövettani elváltozások a hypervascularisációval és hypercellularitással jellemezhető multiplex osteolyticus gócok formájában jelennek meg. Ezek a gócok elsősorban a pericochlearis (35%) és a perilabyrinthae (15%) régióban, az ovális- (90%) és a kerek ablak (40%) szomszédságában, valamint a stapes talpban (95%) keletkeznek (1,3,4). A szövettani elváltozások a stapes szárait rendszerint nem érintik, mert fejlődéstani eredetük nagyban eltér a stapes talptól. A stapes szárai a Reichert-féle porcból származnak (II. úgynevezett hyoid garatív), míg a stapes talp a capsula otica mesodermális régiójából fejlődik ki (1,5). Az aktív otosclerosisos gócokat nagyszámú metabolikusan aktív osteoclast, többmagvú óriássejt, laza kötőszövetes stroma ágyazott fibroblast és proliferáló endothelsejt építik fel. (1. ábra) (1,6,7). Az otosclerosisos gócok kórszövettani aktivitásában a cellularitás, az osteoblastok és osteoclastok jelenléte, a vascularisatio foka és az extracelluláris kollagén mátrix mennyisége alapján négy egymáshoz kapcsolódó grádus különíthető el (1. ábra) (1). A betegség szövettanilag aktív fázisában a hematoxylin-eozin festéssel jellegzetesen sötétkékre festődő hypervascularisált osteolyticus gócok vannak jelen. (1. ábra, A). Az aktív otosclerosis szövettani képét a csontkollagén fibrillumok szövevényes, örvénylő mintázata uralja, amelyek az otosclerosisos gócokban szabálytalanul keresztül-kasul futnak. A normális és a dystrophiás csontállomány között éles határvonalakat írtak le a kollagénrostok mintázatának elemzése alapján (1,4,7). Az otosclerosis időbeni lefolyására jellemző, hogy a korai aktív fázist követően néhány év elteltével a köztes, majd végül az inaktív (kiégett) stádiumába jut el. Ezekben a stádiumokban az osteolysis és az újcsontképződés szövettani jellegzetességei fokozatosan eltűnnek, végül felismerhetetlenné válnak (1. ábra, B,C). Amikor a betegség az inaktív szakaszba lép, akkor az osteoclastok és a többmagvú óriássejtek fokozatosan eltűnnek, de néhány osteoblast és osteocytá még jelen lehet az érintett csontterületen (1. ábra, D). Az inaktív otosclerosisos gócban a korábban tágas vascularis- illetve pseudovascularis terek a lamellaris

csontappozíciónak köszönhetően elmosódottá válnak és beszűkülnek (1. ábra, D) (1). Az otosclerosisos góc a betegség ezen fázisában jellegzetesen eosinophil, rózsaszín hematoxylin-eozin festődést mutat (1. ábra, D) (1). Gyakorta egy adott temporális csonton belül is egyaránt megfigyelhetők aktív- és inaktív otosclerosisos gócok (1,3,4,6). Az otosclerosisos és nem-otosclerosisos stapes fixációk differenciáldiagnózisa a mai napig a műtéileg eltávolított (stapedectomy, stapedotomy) ankylotikus stapes talpak kórszövettani vizsgálatán alapul, mert az olyan preoperatív diagnosztikai eljárások, mint a nagy felbontású CT (HRCT), az MRI, és a tisztahang küszöbaudiometria gyakran bizonytalan eredményeket produkálnak (8,9). Ennek a felismerésnek a jelentőségét jól példázza, hogy a legutóbbi közlemények adatai alapján az ezt megelőzően otosclerosisosnak diagnosztizált stapes fixációknak több mint egyharmada valójában nem-otosclerosisos stapes ankylosis következménye. Mindezek mellett erős korreláció van a stapes fixációk kórszövettani típusa (otosclerosis/nem-otosclerosis), az audiológiai rendellenességek valamint a halláscsökkenés időtartama közt. A mély frekvenciákon mért csot-lég köz értékek, és a 2000 Hz-es frekvencián mért csontvezetési hallásküszöb értékek között szignifikáns eltérés mutatkozott az otosclerosisos- és a nem-otosclerosisos stapes fixációkat összevetve (8,9). Ennek tükrében érthető, hogy az eltérő típusú stapes ankylosisok etiológiájának meghatározásához elengedhetetlen a stapes fixációk kórszövettani és molekuláris biológiai vizsgálatán alapuló differenciáldiagnózisa, mert a jelenlegi diagnosztikus tesztek, és a klinikai jellemzők alapján nem tudjuk egyértelműen elkülöníteni az otosclerosisos- és a nem-otosclerosisos stapes fixációkat.



1. ábra. Az otosclerosis eltérő szövettani stádiumai.

A: szövettanilag aktív (grádus I) otosclerosisos gócek a stapes talp elülső pólusán. Jellemző a hypercellularitás, az intenzív basophil festődés, fehér nyíl jelöli a sokmagvú osteoclastokkal és hyalinnal kitöltött pseudovascularis tereket. **B:** mérsékelten aktív (grádus II) otosclerosisos gócek a stapes talp hátulsó pólusán. A pseudovascularis terek kiszélesedtek, üresek (fehér nyíl). A basophilen festődő osteoid állományban hypercellularitás figyelhető meg, de aktív osteoclastokat nem lehet azonosítani. **C:** inaktív (grádus III) otosclerosisos gócek a stapes talp hátulsó pólusában. Az osteoid állomány eosinophilen festődik, elszórtan osteocytákat figyelhetünk meg a csontban. Fehér nyíllal jelöltük a kiterjedt osteolysis következtében kialakult osteolyticus lacunát. **D:** inaktív, kiégett (grádus IV) otosclerosisos gócek. A sejtmentes osteoid állomány (fehér nyíl) intenzív eosinophil festődést mutat, jól megfigyelhető a cement vonalak szövedékes lefutása, amely jellemző a betegség ezen stádiumában.

Az ábra forrása: Karosi T. és mtsai. Az otosclerosis etiopathogenezise 2010 Fül-Orr-Gégegyógyászat 56 (4) (A szerzők hozzájárulásával).

Az otosclerosis immunhisztokémiai vizsgálatainak eddigi eredményei

Az immunhisztokémiai vizsgálatok gyors elterjedésének köszönhetően az 1990-es évektől kezdődően megindult az otosclerosisos gócek immunhisztokémiai tanulmányozása. Sok közlemény számol be a patológiai értelemben vett gyulladásos folyamatokról, a virális receptorok és vírusantigének jelenlétéről, valamint a kóros kollagén expresszióról, amelyek összefüggést mutathatnak az otosclerosis etiopathogenezisével (10,11,12,13). *Niedermeyer* és

mtsai otosclerosis szövetekben vizsgálták az eltérő kollagén típusok expressziós mintázatát és kifejeződésük mértékét, amelyekben a IV. és V. típusú kollagén fokozott expresszióját írták le. Megjegyzendő, hogy az I típusú kollagén markáns expresszióját tapasztalták az otosclerosis csontléziókban, ellentétben a korábban rokonbetegségnek tartott osteogenesis imperfecta-val. Fontos megemlíteni, hogy a korábban az otosclerosis pathogenezisével kapcsolatba hozott II típusú kollagén expressziója nem mutatott szignifikáns eltérést az egészséges kontrollokhoz viszonyítva (12).

Több kutatócsoport is igazolta a krónikus gyulladás és az ennek következtében végbemenő osteolysis jelentőségét az otosclerosis pathogenezisében: *Arnold* és mtsai CD3⁺, CD4⁺, és CD8⁺ T-sejteket találtak az otosclerosis gócek perivascularis tereiben; *Altermatt* és mtsai C3-C5a komplement fragmentumokat, míg *Schrader* és mtsai β_2 -mikroglobulint mutattak ki az aktív otosclerosis gócekban található osteoclastok és többmagvú óriássejtek felszínén (13,14,15).

Igaz, hogy a későbbiekben több tanulmány is igazolta a perzisztáló, defektív kanyaróvírus fertőzés szerepét az otosclerosis pathogenezisében, azonban mégis *Arnold* és mtsai (13,14) voltak az elsők, akik immunhisztokémiai vizsgálatokkal bizonyították a Paramyxovírusból és rubeola vírusból származó antigének jelenlétét az otosclerosis szövetekben.

Kutatócsoportunk szerint a belsőfül csontos tokjának perzisztáló kanyaróvírus fertőzése fokozhatja a kanyaróvírus receptorának (CD46, vagy membrane cofactor protein „MCP”) expresszióját az otosclerosis gócekban található osteoclastokon és endothelsejteken. Ebben a kísérletben az osteoclastok szignifikánsan fokozott CD46 expressziója volt tapasztalható az otosclerosis minták esetében a kanyaróvírust nem tartalmazó normális és nem-otosclerosis kontroll mintákhoz viszonyítva. Az eredmények tükrében feltételezhető a kapcsolat az otosclerosisra jellemző patológiás csontremodelláció és a capsula otica perzisztáló kanyaróvírus fertőzése, valamint a fokozott CD46 receptor expresszió között (16).

Azt már régóta feltételezték, hogy az otosclerosisra jellemző csontremodellációs gócekban található osteoclast-szerű sejtek fenotípusa egyedi, de az erre vonatkozó első immunhisztokémiai bizonyítékokra még várni kellett (17). *Karosi* és mtsai az otosclerosis gócekban olyan CD51⁺/CD61⁺ embryonalis osteoclastokat és osteoclast prekursor sejteket írtak le, amelyek fiziológiás körülmények között kizárólag az embryonalis fejlődés 4-6. hetében azonosíthatók a capsula oticát alkotó mesodermában (17). Kutatócsoportunk szerint a nyugvó CD51⁺/CD61⁺ embryonalis osteoclastok reaktivációját az otosclerosisban a capsula

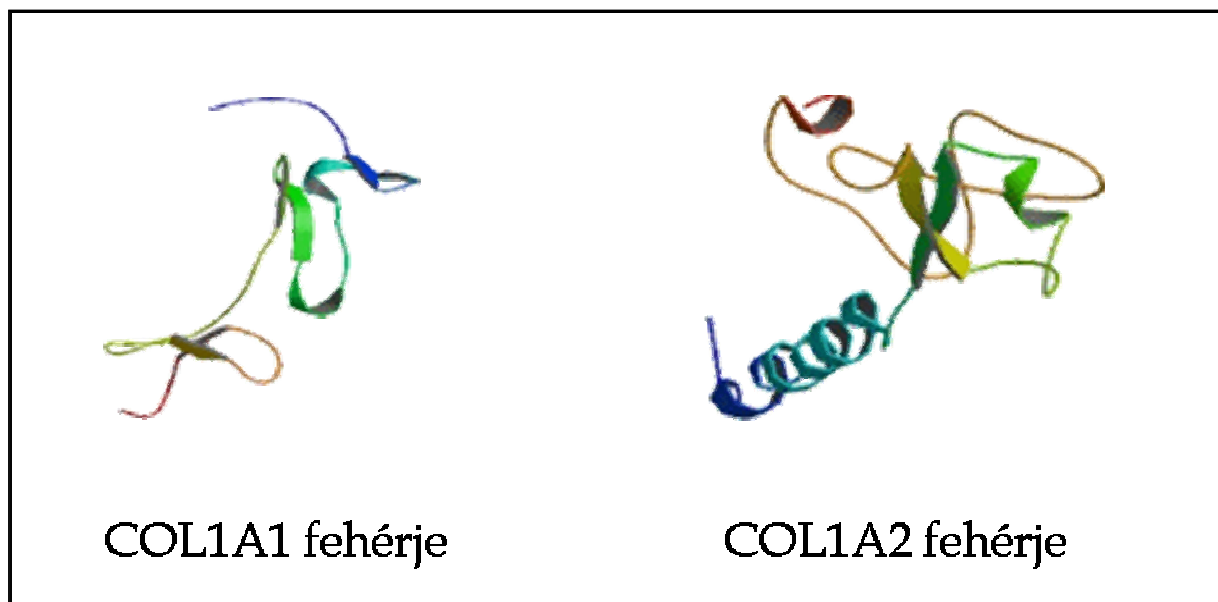
otica perzisztáló kanyaróvírus fertőzése indukálhatja. A $CD51^+/CD61^+$ embryonalis sejtek (pre-osteoclastok és ezek prekurzor alakjai) fenotípusukat tekintve a $CD34^+$ omnipotens őssejtekhez állnak a legközelebb, de a celluláris differenciáció valamivel magasabb fokán állnak. A fentebb említett megfigyelések hasznos adatokat szolgáltathatnak a belsőfül őssejtkutatással foglalkozó szakemberek számára (17). Összegezve a főbb gondolatokat, az otosclerosisban megjelenő gyulladásos csontremodellációs zavar alapját a kanyaróvírus RNS szekvenciákat tartalmazó reaktivált, $CD51^+/CD61^+$ osteoclastok jelenléte valamint a fokozott CD46 expresszió képezheti (16,17,18).

AZ OTOSCLEROSIS GENETIKAI HÁTTERE

COL1-A1/A2 polimorfizmus

Az osteogenesis imperfecta a csökkent (1a,1b), vagy hiányzó (1c, 2) I. típusú kollagén szintézis következtében kialakult genetikai betegség, amely autoszómális domináns módon öröklődik. McKenna és mtsai (19) felvetették, hogy az enyhébb lefolyású osteogenesis imperfecta esetében az I. típusú kollagénben tapasztalt genetikai defektusok összefüggést mutathatnak az otosclerosissal. A klinikai otosclerosis és az I típusú kollagén A1 allél (COL1A1) közötti szignifikáns összefüggéseket három különböző génen belüli polimorf marker segítségével írták le. Ebben a tanulmányban összefüggést találtak néhány otosclerosisos páciens esetében a COL1A1 génben előforduló mutációkkal (19). Későbbi tanulmányukban a fent említett kutatócsoport klinikailag otosclerosisos betegekből származó dermális fibroblaszt tenyészetekben vizsgálta a COL1A1 mRNS expresszióját, hogy azonosítani tudják a COL1A1 gén genetikai eltéréseit az I típusú osteogenesis imperfecta-hoz hasonlóan (20). A legtöbb esetben a COL1A1 allélek expressziója nem mutatott eltérést az egészséges kontrollokhoz viszonyítva, azonban a klinikailag otosclerosisos betegek egy szűkebb csoportjában az egyik COL1A1 allél csökkent expresszióját tapasztalták (20). McKenna és mtsai (21) szignifikáns összefüggést írtak le a COL1A1 első intronjának Sp1 helye és az otosclerosis között. Mivel az Sp1 helyek allélfrekvenciája hasonló volt otosclerosisban és osteoporosisban, így felvetették az esetleges kapcsolat lehetőségét az osteoporosis és az otosclerosis között (21). A szerzők kiemelték, hogy eredményeik megerősítéséhez nélkülözhetetlenek a jövőbeni prospektív klinikai tanulmányok (22). A fentebb említett tanulmányokkal ellentétben Rodríguez és mtsai (23) nem találtak arra

vonatkozóan semmilyen bizonyítékot, hogy az otosclerosisban etiopathogenetikai szerepe lenne a COL1A1 és COL1A2 alléleknek. *Chen és mtsai* (24) azonosították a COL1A1 gén azon haplotípusait, amelyek az otosclerosis iránti fogékonyságért és rezisztenciáért felelősek, s amelyek expressziója szignifikáns összefüggést mutatott az otosclerosisissal a kaukázusi fehér populációban. Mindezen eredmények ellenére meg kell jegyeznünk, hogy az I. típusú kollagén egy nagyon általános struktúrális fehérje, amelynek mutációi több olyan csont abnormalitáshoz vezetnek, amelyek nem korlátozódnak az capsula otica-ra és a stapes talpra. Összefoglalva a COL1A1 gén polimorfizmusa csak néhány otosclerosisos beteg esetében volt ténylegesen kapcsolatba hozható a betegséggel, az esetek döntő többségében más genetikai eltérések lehetőségét is számba kell venni a klinikai otosclerosis kapcsán. A COL1A1 és COL1A2 fehérjetermékek szerkezetét a 2. ábrán mutatjuk be.



2. ábra: A COL1A1 és COL1A2 allélek fehérjetermékeinek szerkezete. Az ábrához felhasznált képek a www.uscnk.com website-ról származnak.

Otosclerosis (OTSC) gének

Mielőtt részletekbe menően tárgyalnánk az ide kapcsolódó tanulmányok adatait, meg kell említenünk, hogy ezen közlemények szerzőinek genetikai vizsgálatai kapcsoltsági analízisen alapulnak, amelyeket stapes fixációban szenvedő pácienseken végeztek el feltételezve az otosclerosis diagnózisát az eltávolított stapes talpak szövettani vizsgálata nélkül (25,26,28,29,30,31).

Az epidemiológiai kutatások többségében olyan családokon végezték el a vizsgálatokat, ahol a stapes fixáció halmozottan fordult elő-, és hozzávetőlegesen 40-45%-os inkomplett penetranciával bíró autoszómális domináns öröklődést mutatott (25,31). A genetikai kapcsoltsági viszonyokkal foglalkozó tanulmányokban nyolc lókuszt jelenlétét írták le (OTSC1-OTSC8), amelyek egyenként a 15q.1, 7q.23, 6p.4, 16p.46, 3p.2, 6p.7, 9p.29 kromoszómákon lokalizálódnak (25,26,27,28,29,30,31). Noha ezek a lókuszok már fel vannak térképezve, fehérjetermékeik ismeretlenek, ugyanakkor nincs információnk ezen géneknek az otosclerosis kialakulásában betöltött tényleges szerepére vonatkozóan. Az igazsághoz az is hozzátartozik, hogy a fenti lókuszokon nem sikerült egyetlen specifikus gént sem azonosítani, a legtöbb DNS szekvencia a humán genom nem kódoló, ún. intronikus régiójához tartozik (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=otosclerosis>). Igaz, hogy némely genetikai asszociációkat vizsgáló tanulmány és a tapasztalt klinikai hasonlóságok felvetették az etiológiai kapcsolat lehetőségét az otosclerosis és az osteogenesis imperfecta között, azonban a két megbetegedés közös genetikai hátterének nincs konkrét bizonyítéka (32,33). Az otosclerosist inkább tekinthetjük egy komplex etiológiájú csontremodellációs betegségnek, mint közönséges monogénes öröklésmentet mutató genetikai defektusnak (33). A fent említett lókuszok további jellemzése és vizsgálata az otosclerosis etiopathogenezisének és öröklődésének pontosabb megértéséhez vezethet.

A KANYARÓVÍRUS ÉS RECEPTORÁNAK (CD46) SZEREPE AZ OTOSCLEROSIS ETIOPATHOGENEZISÉBEN

Perzisztáló kanyaróvírus fertőzés otosclerosisban

A kanyaróvírus fertőzés szerepét az otosclerosis pathogenezisében az elektronmikroszkópos felvételek mellett számos más módszerrel is bizonyították (8,9,10,13,18). A Paramyxovírus fertőzés következtében egyéb csontrendellenességek, mint például a Paget-kór is kialakulhatnak (34). A kanyaróvírus otosclerosisban betöltött etiológiai szerepének tisztázására sok tanulmányt indítottak (8,9,10,13,35,36). A kanyaróvírus olyan negatív egyszálú RNS-t tartalmazó vírus, amely a Paramyxovírus családba tartozik (34). A kanyaróvírus nem rendelkezik neuraminidázzal (NM), de hordoz egy a syntitium képzésért felelős úgynevezett fúziós fehérjét (FP), ezek mellett még hemagglutinin (HP) és haemolizint is tartalmaz. A vírus genetikai anyagának replikációjához és

stabilizációjához elengedhetetlen a mátrix protein (MP) és a nukleoprotein (NP) (34,35). Otosclerosisos osteoclastokban *McKenna* és mtsai (36) elektronmikroszkópos vizsgálatokkal olyan pleomorf filamentózus struktúrákat találtak, amelyek Paramyxovírus partikulumokhoz voltak hasonlóak. A kanyaróvírus-specifikus IgG ellenanyagok jelenlétét a betegségben *Arnold* és mtsai (37,38,39) írták le az otosclerosisos betegekből stapedectomy során kinyert perilympa mintákban. Az otosclerosisos betegekből stapedectomy során eltávolított stapes talpakban, és a post mortem eltávolított cochleáris mintákban sikerült kimutatni a kanyaróvírus MP és NP jelenlétét (37,39). Jelentős mennyiségű MP-t, FP-t, és HP-t sikerült kimutatni az osteoclastok, fibroblastok, embryonális chondrocyták, valamint a proliferáló endothelsejtek felszínén (37,39,40).

Nagyon érdekes, hogy csökkent kanyaróvírus-ellenes IgG szinteket mutattak ki az otosclerosisos betegek szérum mintáiban az egészséges kontrollokhoz képest (41,42). Kutatócsoportunk szerint a vezetékes halláscsökkenés kimutatásának és a kanyaróvírus-ellenes IgG szérum szint meghatározásának együttes alkalmazása kellően magas specifitással (90%) és szenzitivitással (96%) bír az otosclerosis preoperatív diagnózisában. Az eredmények azt igazolják, hogy a normálistól alacsonyabb kanyaróvírus-ellenes IgG szintek a vezetékes halláscsökkenésben szenvedő betegek esetében az otosclerosisra utalhatnak, a szerokonverziót igazoló 12 IU/ml feletti értékek pedig a nem-otosclerosisos stapes fixációk diagnózisát erősítik meg (42). A kanyaróvírus RNS jelenlétét az otosclerosisos stapes talpakban RT-PCR technikával több kutatócsoport is igazolta (43,44,45). *Karosi* és mtsai (44) a kanyaróvírus RNS-ének RT-PCR-rel történő kimutatását és az otosclerosis szövettani igazolását egyedi stapes mintákon elsőként végezték el, mely több hazai egyetem egyedülálló együttműködésének eredményeként jöhetett létre.

A fentebb említett megfigyelésekkel ellentétben *Grayeli* és mtsai (46) nem tudtak kanyaróvírus eredetű RNS-t kimutatni az otosclerosisosnak vélt stapes talpaktól. Az ellentmondásos eredmények hátterében az állhat, hogy *Grayeli* és mtsai egy viszonylag régi, nagyobb nukleinsav igényű RT-PCR technikát alkalmaztak, s emiatt nem volt lehetőségük a párhuzamos szövettani vizsgálatok elvégzésére a négy stapedectomy során eltávolított stapes talp esetében (46). A szakirodalomban nemrégiben jelent meg egy közlemény, amely szerint *Komune* és mtsai (47) nem tudták kimutatni a kanyaróvírus jelenlétét otosclerosisos szövetekből, és a vírus tenyésztésére irányuló kísérleteik is sikertelenek voltak. A sikertelenség hátterében az állhat, hogy megkérdőjelezhető, hogy a vizsgált minták valóban otosclerosisosak voltak-e. Az otosclerosis földrajzi előfordulására jellemző, hogy az É-európai populációban a leggyakoribb, azonban itt is csak a stapes fixációk mintegy

kétharmada szövettanilag is igazolhatóan otosclerosis, ezt a saját vizsgálataink során kapott eredményeink is megerősítik. Az otosclerosis előfordulási gyakorisága az ázsiaiak között a legalacsonyabb, ami valószínűleg NOG gén mutációjával magyarázható, mert a mutáns fenotípus kongenitális stapes fixációt idéz elő (48,49). Ezért az ázsiaiában operált stapes fixációk döntő hányada nem otosclerosisos stapes fixáció. Ezen tények tükrében érthető, miért nem sikerült egyetlen esetben sem kimutatniuk a kanyaróvírus genom jelenlétét az otosclerosisosnak vélt műtéti mintákból. Ez a tény magyarázattal szolgálhat a szövettenyésztes vizsgálatok sikertelenségére is.

Végkövetkeztetésként elmondható, hogy a fenti bizonyítékok tükrében az otosclerosis egy pathológiai értelemben vett gyulladásos megbetegedés, amely erős korrelációt mutat a capsula otica perzisztáló kanyaróvírus fertőzésével.

A kanyaróvírus receptor (CD46) és az alternatív splicing során keletkező receptor izoformák szerepe

Ahogy azt már korábban említettük, a kanyaróvírus humán celluláris receptora membrán kofaktor proteinként is ismert CD46 antigén a capsula otica sejtjeiben. A CD46 alapvető funkciója, hogy kofaktorként működik közre a C3b és C4b komplement komponensek szérum faktor I általi inaktivációjában, amivel hozzájárul a gazdaszervezet védekezéséhez a komplement rendszer túlzott aktiválódása által okozott károsodásokkal szemben. A CD46 gén az 1. kromoszóma 1q32 régiójában helyezkedik el, a génről egyetlen mRNS íródik át, amely poszt-transzlációs módosításokon megy keresztül az alternatív splicing során. A CD46 egy olyan polimorf I. típusú transzmembrán glikoprotein, amelynek eddig 14 alternatív splicing variánsát írták le. Ezek a variánsok eltérő mintázatban minden sejtmaggal rendelkező emberi sejt felszínén kifejeződnek (50). Az egyes izoformák együttes előfordulásához (ko-expresszió) korábban még nem tudtak speciális funkciókat hozzárendelni. Ki kell emelnünk azt a tényt, miszerint a CD46 által közvetített szignálok hatékonyabb T-sejt aktivációt képesek előidézni, mint a hagyományosan a CD3 és CD28 molekulák által közvetített molekuláris stimulusok (50). Kutatócsoportunk vizsgálatai során fokozott CD46 immunreakciót tapasztaltunk az otosclerosisos stapes talpakban (10,50). Mindemellett az otosclerosisos stapes talpakban négy olyan új CD46 splicing variánst találtunk, amelyeket *os1*, *os2*, *os3* és *os4*-nek neveztünk el. Az újonnan leírt CD46 izoformák a molekula két régiójában mutatnak speciális tulajdonságokat, a transzmembrán domén, vagy rövidebb, vagy hiányzik, és egy rendkívül ritkán előforduló citoplazmatikus farok régióval

rendelkezik, amely feltehetően megváltozott jelátvitelt eredményez. Ezen változások ellenére a kanyaróvírus megkötő képességük változatlan maradt. Az otosclerosis szervspecifitásának és virális pathogenezisének hátterében a CD46 izoformák otosclerosisra jellemző speciális expressziós mintázata, és az otosclerosis-specifikus izoformák megváltozott funkciói állhatnak (50).

AUTOIMMUNITÁS ÉS GYULLADÁS

Kollagén-ellenes autoantitestek

Az otosclerosis egyik lehetséges etiológiai tényezője a capsula otica elleni autoimmun reakció, azonban az erre vonatkozó eredmények valamelyest ellentmondóak (18). Yoo és mtsai (51) voltak az elsők, akiknek sikerült a II típusú kollagénnel szembeni autoantitesteket kimutatni az otosclerosisos betegek szérum mintáiban. A fent említett eredményekkel szemben Sørensen és mtsai (52) valamint Lolov és mtsai (53) nem tapasztaltak szignifikáns eltérést a II-es típusú kollagén-ellenes autoantitestek mennyiségében az otosclerosisos betegeket az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. Mindemellett Lolov és mtsai (53) kismértékben emelkedett autoantitest koncentrációkat tapasztaltak azon otosclerosisos betegek szérum mintáiban, akik a betegség előrehaladottabb állapotában voltak. A további kísérletes munka során Joliat és mtsai (54), Bujía és mtsai (55) valamint Helfgott és mtsai (56) emelkedett szérum autoantitest koncentrációkat tapasztaltak a II. és a IX. típusú kollagénnel szemben az otosclerosisos betegek esetében az egészséges kontrollokhoz képest. A továbbiakban Yoo és mtsai (57) azt tapasztalták, hogy olyan lyticus csontléziókat lehet előidézni patkányok capsula otica-jában a II. típusú kollagénre specifikusan indukált autoimmun reakció segítségével, amelyek megjelenésükben nagyon hasonlítanak az otosclerosisban tapasztalt osteolyticus gócokhoz. Ez lehetne az otosclerosis autoimmun állatmodellje, de eredményeiket eddig még senkinek sem sikerült megismételnie, Harris és mtsai (58) sem tudtak ilyen jellegű elváltozásokat azonosítani hasonló állatmodelljükön. Mindezek alapján megállapítható, hogy a kollagénnel szembeni autoimmun reakciónak közvetve szerepe lehet az otosclerosis pathogenezisében, azonban primer etiológiai tényezőként nem vehető számításba (18,57).

Transzformáló növekedési faktor béta 1 (Transforming growth factor β 1, TGF- β 1)

A TGF- β 1 egy olyan széles körben elterjedt (ubikviter) citokin, amelynek különböző gyulladásos megbetegedésekben, a szöveti fibrózisban és gyógyulásban, valamint az otosclerosis pathogenezisében is szerepe lehet. Néhány eset-kontroll tanulmány eredményeinek elemzése alapján a TGF- β 1 expresszió szoros kapcsolatban áll az otosclerosis pathogenezisével. Egy nagy belga-, holland és francia tagokból álló kutatócsoport SNP (egyedi nukleotid polimorfizmus - *single nucleotide polymorphism*) analízisének eredményei szignifikáns összefüggést mutattak a TGF- β 1 génben előforduló T263I SNP és az otosclerosis között. A vizsgált csoportokban az általánosan széles körben elterjedt I263 variáns alul-reprezentált, ennek következtében védelmet nyújthat a betegséggel szemben (60). Ezt követően Thys és mtsai (61) a fentebb említett eredményeket kiegészítették azzal, hogy az I263 allélikus variáns protektív hatású, valamint biológiailag sokkalta aktívabb, mint a T263-as „otosclerosis-rizikó” allél. Ugyanez a kutatócsoport négy otosclerosisos betegben a TGF- β 1 három eltérő variánsát (E29, A29 és I241) írta le, ami kihatással lehetett a TGF- β 1 aktivitására és funkciójára. A fentebb említett tanulmány adatai azt sugallják, hogy az otosclerosis szembeni fogékonysághoz hozzájárulhatnak a TGF- β 1 különböző ritka aminosav variánsai. Bodo és mtsai (62) TGF- β 1-el kezelték otosclerosisos betegek műtéti anyagából származó sejtenyészeteket, aminek hatására a TGF- β 1 elnyomta a teljes kollagén és glükózaminoglikán szintézist, ezzel egyidejűleg fokozta a fibronectin szekréciót az otosclerosisos sejtekben a normál sejtekhez viszonyítva. Ezen tények ismeretében elmondható, hogy a TGF- β 1 a módosult extracelluláris mátrix termelésén keresztül szerepet játszhat az otosclerosis pathogenezisében.

Tumor nekrosis faktor-alfa (TNF- α) és az osteoprotegerin-RANK-RANKL rendszer következményes apoptózis

Eddigi eredményeink alapján feltehető, hogy az otosclerosisban lejátszódó gyulladásos csontremodellációs zavart az apoptózist gátló (hCIAP1/2) és serkentő (Granzyme- β) szabályozó fehérjék fiziológiás egyensúlyának TNF- α által okozott felborulása magyarázhatja. Az 1-es típusú (hCIAP1, baculoviral inhibitor of apoptosis repeat 2) és a 2-es típusú (hCIAP-2, baculoviral inhibitor of apoptosis repeat 3) apoptózis inhibitorok egy olyan fehérje szupercsaládba tartoznak, melynek tagjai a TNF- α receptor asszociált faktorok (TRAF1, TRAF2) megkötésével és az ICE-szerű (interleukin-1 converting enzyme) proteázok

degradálásával képesek az apoptózis gátlására (63,64,65). A hCIAP1 a menadionnal kiváltott apoptózist is képes gátolni (66,67,36). Ez azért kiemelten fontos, mert a menadion (és számos citotoxikus szer pl. cisplatin) hatására szabadgyökök képződnek, amelyek központi szerepet játszanak bizonyos szenzorineurális halláscsökkenés pathogenezisében.

A Granzyme- β -t (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte associated serine esterase 1) CD8 pozitív cytotoxicus T-sejtek és NK-sejtek termelik (67,68). Jelenlegi ismereteink szerint a fent említett sejtek úgy védik meg a szervezet egészséges sejtjeit, hogy a különböző nem-saját antigéneket kifejező, legtöbbször intracelluláris pathogénnel fertőzött sejtekben apoptózist indukálnak (63,69,70). A Granzyme- β központi szerepet tölt be a célsejtek gyors apoptózisának kiváltásában (63,70).

Az otosclerosis csontszövetben észlelhető fokozott TNF- α expresszió az, amely kiterjedt osteoclast aktivációt és csont reszorpciót eredményezhet (71,72,73). A TNF- α egy olyan proinflammatorikus cytokin, amelynek lényeges szerepe van az otosclerosis során végbemenő osteolysisben és az osteocyták osteoblasttá, valamint monocyta-típusú sejtek osteoclasttá történő differenciálódásában (71). A TNF- α az osteoclastok és osteoblastok közötti kommunikáció fontos paracrin mediátora, amelyet a macrophagok, B-sejtek, T-sejtek és aktivált monocyták termelnek (72,73). Az osteoprotegerin (OPG), amelyet a nomenklatura szerint TNFRSF11b-nek (Tumor Necrosis Factor- α Super Family Member 11b) is neveznek egy gátló funkciójú glikoprotein, ami gátolja az osteolysist és az osteoclastok képződését, valamint az aktivált osteoclastok apoptózist segíti elő (71). Ezen funkciók ismeretében világos, hogy az OPG fő feladata a kiegyensúlyozott osteoclast és osteoblast működéssel jellemezhető fiziológiás csontremodelláció (turnover) biztosítása (72,73). Az OPG „*decoy*” receptorként funkcionál, ugyanis gátolja a kölcsönhatást a RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B) és ligandja a RANKL között, megfékezve ezzel az osteoclastok képződését, aktivációját és toborzását (3. ábra) (72,73). Zehnder és mtsai (74) kísérleteik során az OPG-deficiens egerek capsula otica-jában az otosclerosisban megjelenő csontremodellációhoz hasonló elváltozásokat tapasztaltak. Kutatócsoportunk feltevései szerint a betegség korai, szövettanilag aktív fázisában gyulladásos cytokinek (TNF- α , IL-1, IL-6), citotoxikus enzimek (elasztáz, kollagenáz, katepszinek), valamint komplement fragmentumok (C3a, C3b, C5a) szabadulnak fel az otosclerosis gócból (72,73). Ezek a mediátorok a perilymphába jutva a külső szőrsejtek elektromotilitásának gátlásához vezethetnek (72,73,75). Ahogy arra a későbbiekben még részletesebben kitérünk, a fent említett eredmények tükrében az anti-cytokin terápia hatékony lehet az otosclerosis kezelésében a betegség korai gyulladásos fázisában.

Csont morfogenetikus fehérje (Bone morphogenetic protein, BMP)

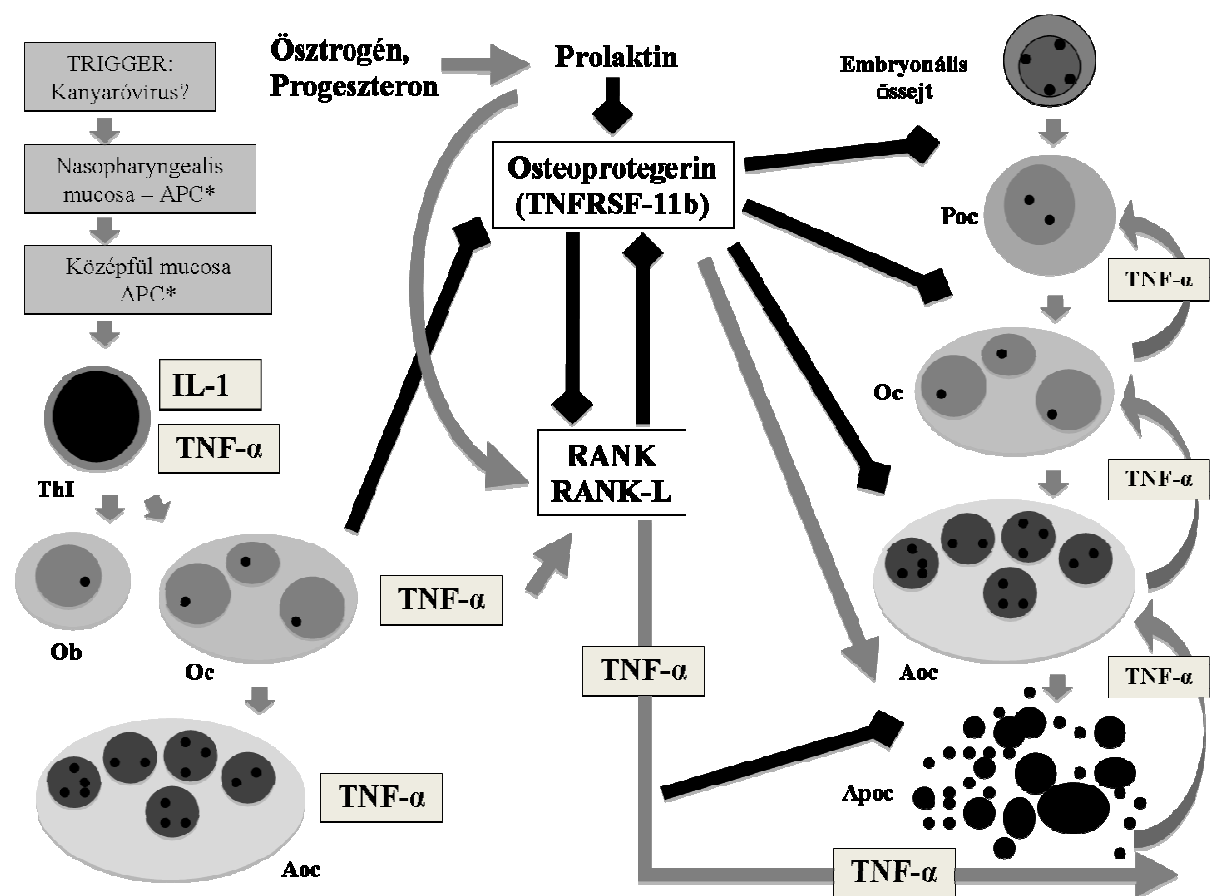
A BMP egy a csontanyagcserében központi szerepet betöltő szabályozó fehérje, amelynek kiemelt jelentősége van a szervezetben végbemenő új csont képződésében, és a rekonstrukcióban (76,77). Emellett gyulladásos cytokinként is funkcionál, a TGF- β szupercsalád számos tagjához hasonlóan. Ezért érthető, hogy *Schrauwen* és *mtsai* (76) miért vizsgálták a különböző BMP izoformák expressziójának kockázati szerepét az otosclerosis kialakulását kísérő kóros csontremodellációban. Kísérleteik során szoros, szignifikáns összefüggést tártak fel a BMP2 és BMP4 izoformák expressziója és az otosclerosis között. A különböző BMP izoformák és receptorok immunhisztokémiai vizsgálatát *Lehrendt* és *mtsai* (77) végezték el otosclerosisos szövetekben, ahol a léziókban a BMP2, a BMP4, és a BMP7 markáns expresszióját tapasztalták. A BMP receptorok vizsgálata során a BMPR-1 és a BMPR2 mutattak szignifikáns immunreakciót, ellenben a BMPR-1A nem adott értékelhető immunreakciót. Szintén ez a kutatócsoport a későbbiekben az aktív otosclerosisos szövetekben előforduló különböző BMP izoformák tipizálását is elvégezte. Eredményeik ismét a BMP2, BMP4, BMP7 következetes jelenlétét támasztották alá az otosclerosisos szövetekben (78). Az eredmények alapján logikusnak tűnik a feltevés, hogy a BMP eltérő variánsai befolyásolják a betegség korai szakaszában lejátszódó molekuláris pathológiai mechanizmusokat.

HORMONÁLIS ÉS METABOLIKUS TÉNYEZŐK

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS)

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszernek (renine-angiotensine-aldosterone-system, RAAS) szerepe lehet a lokalizált és a szisztémás csontremodelláció szabályozásában, mert az angiotenzin II (AG II) stimulálja a TNF- α és az IL-6 szerkéciót. *Grayeli* és *mtsai* (79) véleménye szerint a RAAS aktivitás a következő néhány gén polimorfizmusával van összefüggésben: az AGT M235T, amely az angiotenzinogén (AGT) szérum és szöveti koncentrációjának szabályozásáért felelős, az ACE I/D, amely az angiotenzin konvertáló enzim (angiotensine converting enzyme, ACE) aktivitásáért felelős, és az AT(1)R A/C(1166),

amely az angiotenzin II receptor (angiotensine receptor, ATR) funkciójáért felelős. Az említett polimorfizmusokat egy nagy francia populáció vizsgálatát követően írták le, de meg kell említeni, hogy csupán hat otosclerosisos betegből származó stapes talp állt rendelkezésükre, amelyeket részletesebben megvizsgálhattak molekuláris biológiai módszerekkel és szövettanyésztéssel egyaránt. A fent említett kutatók az AGT M235T és a ACE I/D polimorfizmus valamint az otosclerosis kialakulása között szignifikáns összefüggést írtak le, de nem találtak bizonyítékot a betegség és az AT(1)R valamint az A/C(1166) polimorfizmusok közötti kapcsolatra. Ezek alapján feltételezhetnénk a lokális RAAS aktivitás és az otosclerosis közötti kapcsolatot, de *Schrauwen* és *mtsai* (80) legutóbbi tanulmányukban egyértelműen kizárták ennek lehetőségét.



3. ábra: Az otosclerosis során végbemenő gyulladásos csontremodelláció etiopathogenetikai modellje.

A kiváltó „trigger” által aktivált és MHC-I restrikciót mutató sejtes immunválasz osteoclast aktivációhoz és emelkedett TNF- α expresszióhoz vezet. A TNF- α negatív visszacsatolással hat az osteoprotegerin expresszióra, mialatt fokozódik a RANK expresszió és a RANKL szekréció. Végül ez osteoclast túlaktiválódást eredményez, amelyet osteolysis és a csökkent osteoclast apoptózis kísér. A prolaktin hatásos aktivátora a RANK-nak és a RANKL szekréciónak. Jelölések: fekete nyíl: gátlás; szürke nyíl: aktiváció; Aoc: aktivált osteoclast, APC: antigén prezentáló sejt; Apoc: apoptotikus osteoclast; IL-1: Interleukin 1; Ob: osteoblast; Oc: osteoclast; Poc: preosteoclast; RANK: Receptor Activator of Nuklear Faktor kappa b; RANKL: Receptor Activator of Nuklear Faktor kappa b Ligand; Th1: I típusú Helper T-sejt; TNF- α : Tumor Nekrózis Faktor alfa; TNFRSF-11b: Tumor Nekrózis Faktor Receptor Szupercsalád 11b.

Az ábra forrása: Karosi T. és mtsai. Az otosclerosis etiopathogeneze 2010 Fül-Orr-Gégegyógyászat **56** (4) (A szerzők hozzájárulásával).

A „dystrophic dysplasia” szulfát transzporter (DDST)

A DDST egy olyan enzim, amelyet csak nemrég azonosítottak, és szerepe van a szulfát adsorptióban és readsorptióban, amely a normális csontremodellációhoz (turnover) szükséges az újcsontképződés szabályozásakor. Grayeli és mtsai (81) fokozott DDST aktivitást tapasztaltak az otosclerosisos csontmintákban, azonban a DDST mRNS expressziója az otosclerosisos szövettenyészetekben nem tért el a normálistól. Megemlítendő, hogy a DDST

aktivitás és az otosclerosis során fellépő szenzorineurális halláscsökkenés súlyossága jó korrelációt mutatott egymással. Ennek köszönhetően a DDST speciális célpontja lehet az otosclerosis gyógyszeres kezelésének a jövőben (81,82).

Parathormon (PTH) és PTH-related peptid (PTHrP) receptorok

Az már széles körben ismert, hogy a D-vitamin antagonistá hatásának gátlásával a PTH és a PTHrP fokozza a csontresorptiót s indukálja az osteolysist. *Grayeli és mtsai* (83) valamint *Fanó és mtsai* (84) voltak azok, akik otosclerosisos sejtkultúrákban a PTH és PTHrP szignifikánsan alacsonyabb expresszióját igazolták a hormonális (aktív D3-vitamin) stimulációra adott csökkent sejtválással. Az említett közlemények adatai alátámasztják azt az elképzelést, miszerint a PTH-ra és PTHrP-re adott abnormális sejtválasz (amibe a csökkent receptor expresszió és a receptor deszenzitizáció is benne foglaltatik) segíti az otosclerosis során megfigyelhető abnormális csontremodelláció kialakulását (83,84).

Nemi hormonok

A nemi hormonok szerepére az otosclerosis kialakulásában abból a tényből következtethetünk, hogy a betegség 2-3-szor gyakoribb a nők, mint a férfiak között. Ahogy azt már korábban említettük, a szervezetben a magasabb ösztrogén és progeszteron szintekkel jellemezhető állapotok, és az ösztrogén-progeszteron-prolaktin rendszer más betegségei is hozzájárulhatnak a már kialakult otosclerosis progressziójához (85,86,87,88). Az OPG-RANK-RANKL rendszer részletes jellemzését már fentebb olvashatták. Ehhez kapcsolódik az, hogy az ösztrogén képes indukálni az osteoclastok apoptózisát, mivel csökkenti az osteoclastok válaszát a RANKL kötődésére (3. ábra). A prolaktin felszabadulásának nagy hatásfokú stimulátorai az ösztrogén és a progeszteron. A csontokban tapasztalható csökkent ásványi anyag koncentráció is utalhat hiperprolaktinémiára, amely egyaránt lehet fiziológias vagy patológias eredetű. A legutóbbi irodalmi adatok tanulsága szerint a prolaktin csökkenti, az OPG pedig fokozza a RANKL termelését (3. ábra). Az ösztrogén védő hatásával szemben az ösztrogén-indukált hiperprolaktinémia ellenállhat, mivel gátolja az OPG védő rendszerét. Ez állhat annak hátterében is, hogy miért fokozhatja az otosclerosis és a vestibularis betegségek kockázatát a hormonpótló kezelések alkalmazása, és az orális fogamzásgátlók szedése. A hiperprolaktinémia kapcsolatban van a terhességgel és a tejelválasztással, ez

ugyancsak az otosclerosis megnövekedett kockázatának alapját képezheti többes (multiparitas) terhességekben (88).

AZ OTOSCLEROSIS NEM-SEBÉSZI KEZELÉSE - TERÁPIÁS MEGFONTOLÁSOK

Manapság az otosclerosis következtében kialakult vezetékes halláscsökkenés kezelésében a sebészi megoldás (stapedectomy, stapedotomy) tekinthető az elsődleges terápiás eszköznek. Mindazonáltal a fentebb említett autoimmun-gyulladásos tényezők, és a csontanyagcsere szabályozásának zavarai alapján mérlegelnünk kell a gyógyszeres terápia lehetőségét a betegség korai aktív szakaszában. A gyógyszeres kezelés alatt elsősorban az osteoporosis elleni szerek, az immunszuppresszív és gyulladáscsökkentő gyógyszerek értendők (18).

A nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) tesztelését egy II. típusú kollagén-indukált patkány-otosclerosis modellen végezték el (89). A kipróbált szerek közül az indomethacin adagolását követően szignifikánsan csökkent kollagénáz termelést és csont reszorpciót tapasztaltak (89). Az indomethacin kezelés gátolta az osteoclastok számának emelkedését, és a csont resorptió kizárólag a *bulla otica*-ban volt tapasztalható. Ezzel szemben az indomethacinnal nem kezelt kontroll csoportban a *bulla otica*-n kívül is kiterjedt osteolysis volt megfigyelhető (90).

Dexamethasonnal a primer otosclerosisos sejtkultúrákban csökkenthető volt a DDST aktivitás, valamint az IL-6 expresszió, amely dózisfüggő hatást mutatott, és az RU 486 kódnévvel jelölt (fejlesztés alatt álló) glükokortikoid antagonistával gátolható volt (82). A kortikoszteroidok hatása markánsabban jelentkezett az autoantitest pozitivitással társuló otosclerosisos betegeknél, mint az autoantitest negatív betegtársaik esetében (91). Megemlítendő, hogy az intratympanalis dexamethason instillatio a korábban negatívként értékelhető TEOAE (Torziós Otoakusztikus Emisszió) és DPOAE (Disztorziós Otoakusztikus Emisszió) válaszokat pozitívvá változtathatja a hallásvizsgálat során (92).

Az otosclerosis korai gyulladásos szakaszában tapasztalható szenzorineurális halláscsökkenés esetében az anti-TNF- α biológiai szerek (Remicade™, Humira™, Enbrel™) terápiás lehetőséget biztosíthatnak, mivel a proinflammatorikus cytokinek, köztük a TNF- α is jelentős mennyiségben termelődnek az aktív otosclerosisos gócokban (18,72,73). Mindössze egyetlen tanulmány áll csak rendelkezésünkre, amelyben az autoimmun szenzorineurális

halláscsökkenések (autoimmune inner ear disease, AIED) esetében vizsgálták az infliximab (Remicade™) lokális perfúziójának hatékonyságát. A kísérlet során olyan AIED-ben szenvedő betegeket vizsgáltak, akiknél nem lehetett fokozatosan lecsökkenteni a kortikoszteroid dózisokat, valamint relapsus volt megfigyelhető a kortikoszteroid kezelés felfüggesztését követően. A vizsgált betegeket, - akiknél előzetesen ventilációs tubus insertiót végeztek - négy hétig kezelték hetente egyszer intratympanális infliximab perfúzióval. A TNF- α blokkoló beadását követően a betegek többségénél csökkentek a csontvezetési hallásküszöb értékek, és a kortikoszteroid kezelés is felfüggeszthető volt. A kísérlet során a vizsgált 9 páciens közül összesen 7 reagált tartósan az infliximab kezelésre (93).

A csontanyagcserében kiemelt szerepet betöltő BMP hatásos gátlószerei a biszfoszfonátok. Klinikai vizsgálatok alapján felvetették a biszfoszfonát kezelés terápiás alkalmazását az otosclerosis korai aktív stádiumában (94). *Brookler* és *mtsai* (95) igazolták az etidronát kezelés alkalmazhatóságát az otosclerosis során kialakuló szenzorneurális halláscsökkenés és fülzúgás (tinnitus) kezelésében.

Az osteoporosis és az otosclerosis kezelésében is egyaránt alkalmazható a rekombináns emberi kalcitonin (18,89,96). A lazac kalcitonin kezelés eredményeként egyetlen otosclerosisos beteg állapotában tapasztaltak javulást a szédülést, és hallást érintő panaszokat illetően (96). Állatkísérletek során az in vivo adagolt kalcitoninnal sikeresen gátolták a kollagenáz termelést és aktivitást, valamint a csont resorptiót a II. típusú kollagén segítségével kiváltott otosclerosis-szerű léziókban (89).

Brookes és *mtsai* (97) 47 klinikailag otosclerosisos betegben vizsgálták a D-vitamin potenciális hiányát. A vizsgált betegek 22%-ánál a vérplazma 25-hidroxi-D3-vitamin szintje abnormálisan alacsony értékeket mutatott, valamint a betegek 33%-ánál találtak fokozott alkalikus-foszfataz aktivitást. A fenti eredmények figyelembe vételével arra a konklúzióra jutottak, hogy a fokozott aktív D3-vitamin bevitel jótékony hatású lehet az otosclerosisos betegek gyógyszeres terápiája során (18,97).

A kóros csontremodelláció hatékony antagonistái a nátrium-fluorid és más fluorid-származékok, mert csökkentik az osteoclastok aktivációját, és az ennek eredményeként meginduló osteolysist a molekuláris szabályozó folyamatok gátlásával. Ezt igazolja az a tanulmány is, amelyben a fluorid kezelést követően, a DDST gátlásának következtében csökkent szulfát felvételt tapasztaltak az otosclerosisos szövettenyészetekben (81). Úgy tűnik, hogy a nátrium-fluorid anélkül képes stabilizálni a csont veszteséget osteoporosisban és Paget-kórban, hogy a patológiás csonttörések incidenciája növekedne. A *Vartiainen* és *mtsai* (98) által készített tanulmány eredményei szerint a fluorozott csapvizet fogyasztó betegek

esetében a légvezetési hallásküszöb értékek szignifikánsan jobbak voltak azon betegtársaik eredményeinél, akik fluorid-szegény vizet ittak. Ehhez hasonló szignifikáns eltérések voltak a két betegcsoport között a csontvezetési küszöbértékekben az 1, 2, 4 kHz-es frekvenciák átlagában. Szintén ez a kutatócsoport készítette el azt a tanulmányt, amely a stapedectomy során kialakult hosszútávú hallásjavulást vizsgálta Finnország azon régióiban, ahol a természetes vízkészlet fluorid tartalma rendkívül alacsony. Eredményeik nem mutattak szignifikáns eltérést a fluoridos csapvizet és az alacsony fluorid tartalmú vizet fogyasztó betegek között. A tapasztalatok alapján a kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy a pótlólagos napi 1-3 mg nátrium-fluorid bevitel az alacsony fluorid tartalmú vizekkel ellátott területeken nem elég magas ahhoz, hogy a stapedectomy utáni hallásjavulásra nézve szignifikáns hatása legyen (99). *Causse* és *mtsai* (100) véleménye szerint a magas (>60 mg/nap) nátrium-fluorid bevitellel meggátolhatóak és visszafejleszthetőek az otosclerosis során bekövetkező csontos elváltozások a labyrinthus csontos részén. *Coletti* és *mtsai* (101) a klinikai otosclerosisban szenvedő betegek esetében, a betegség korai fázisában ellenőrizték a stapedius reflex kiválthatóságát, hogy igazolni tudják a nátrium-fluorid kezelés hatékonyságát. A prospektív, követéses vizsgálatokkal kimutatták a fluorid stabilizáló hatását a betegség korai, aktív szakaszában. A nátrium-fluorid kezelés alkalmazásával az esetek több mint 60%-ában volt feltartóztatható a betegség progressziója két éves nyomonkövetés mellett, és az esetek több mint 50%-ban öt éves nyomonkövetéssel is. *Bretlau* és *mtsai* (102) készítették el azt a prospektív, klinikai, kettős vak, placebo-kontrollált tanulmányt, amelyben a nátrium-fluorid kezelés hatékonyságát vizsgálták az otospongiosisos (aktív otosclerosis) betegek esetében. Eredményeik a halláscsökkenés szignifikáns rosszabbodását mutatták a placebo-csoportokban, a napi 40 mg-os dózisokkal kezelt csoportokhoz képest. Összegezve az eddigi tapasztalatokat elmondható, hogy a nátrium-fluorid jó terápiás szer lehetne a korai stádiumú aktív otosclerosisban szenvedő betegek számára, de mégsem terjedt el széles körben, mert csak magas (50-60 mg/nap) dózisokban alkalmazva lehet hatékony. A nátrium-fluorid ilyen magas koncentrációban történő alkalmazása azonban komoly mellékhatásokat eredményezhet, többek között vese-, máj- és szívelégtelenséget, dysostosis, spinalis stenosis és más szövődményeket.

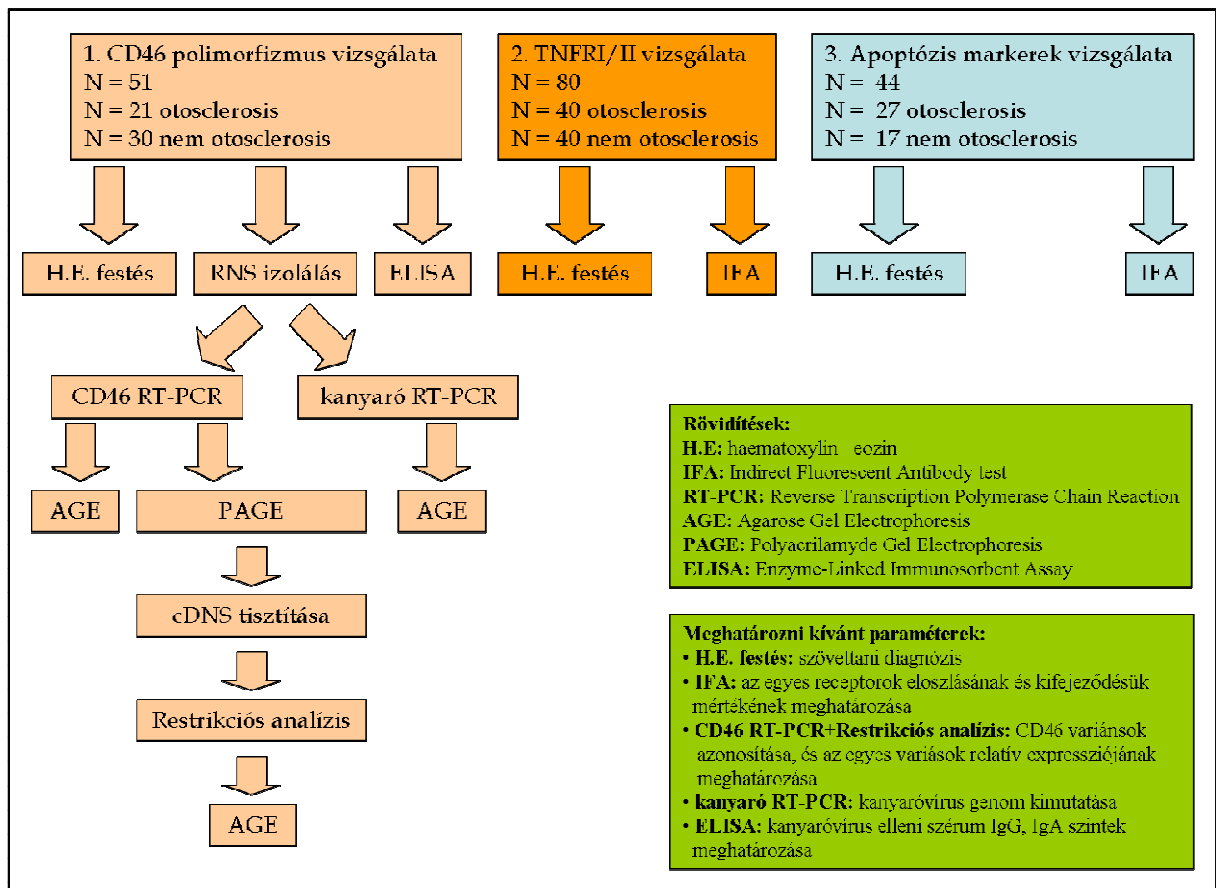
Az otosclerosis korai fázisában markáns anti-osteolyticus hatás érhető el a rövid távú rekombináns OPG (OPG-Fc) kezeléssel. A betegség gyulladásos szakaszában a rekombináns OPG-Fc kezelés rendkívül hasznos lehet a RANK-mediálta osteolysis megszakításának és a normális csontremodelláció megtartásának köszönhetően (72,73) (3. ábra).

CÉLKITŰZÉSEK

A kísérletes munka megtervezésénél a stapes fixációk közül elsősorban az otosclerosisra koncentrálni az alábbi irányvonalakat jelöltük ki:

1. A kanyaróvírus jelenlétének kimutatása RT-PCR technikával (mátrix protein „MP” és nukleoprotein „NP” specifikus primerek felhasználásával), Ehhez kapcsolatosan a capsula otica CD46 expressziós mintázatának feltérképezése, amely magyarázatot adhat a kanyaróvírussal szembeni szervspecifikus fogékonyságra.
2. A kanyaróvírus genom kimutatása mellett a kanyaróvírus ellenes IgG és IgA szintek meghatározása a vizsgált betegek szérumban ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) technika segítségével.
3. A TNF- α receptorok (TNFRI és II) expressziós szintjeinek és mintázatának vizsgálata a normális, nem-otosclerosisos és otosclerosisos stapes talpakban. Ezzel bizonyítható, hogy a TNF- α központi szerepet játszik az otosclerosisos csontátépülés pathogenezésében. Eredményeinkből áttekintően következhet, hogy a betegség korai gyulladásos szakaszában kialakuló szenzorineurális halláscsökkenéssel szemben valóban hatékony terápiát jelenthetnek az anti-TNF- α biológiai szerek.
4. Az otosclerosisban tapasztalható kóros csontremodelláció következtében megjelenő felborult csontanyagcsere (turnover) és a csontsejtek (osteoclast, osteoblast, osteocyt) apoptózis/túlélés szabályozásának zavarai közötti összefüggések feltárása.
5. Hagyományos haematoxylin-eozin festéssel az otosclerosisos esetek elkülönítése a nem-otosclerosisos stapes fixációktól. Szöveti jellegzetességek meghatározása a stapes fixációk kórszöveti differenciáldiagnózisában.

Fenti célkitűzésinket szem előtt tartva három kísérletsorozatot indítottunk, amelyeket a 4. ábrán látható blokk-séma segítségével kívánjuk bemutatni.



4. ábra: A kísérletes munka blokk-sémája.

METODIKÁK

BETEGEK

Jelen dolgozat három kísérletsorozat eredményeit foglalja össze, elemzi és értelmezi, ennek megfelelően a kísérletekhez felhasznált beteganyagot 3 részre bontva mutatjuk be:

1. Az otosclerosishoz kapcsolható CD46 variánsok restrikciós analízise (kanyaróvírus-specifikus RT-PCR, CD46-specifikus RT-PCR, restrikciós tipizálás, haematoxylin-eozin festés, ELISA).

Ebben a kísérletben ötvenegy stapes talpat vizsgáltunk (n=51; férfiak=17, nők=34), amelyeket klinikailag stapes fixációval jellemzett betegekből stapedectomy során távolítottak el. Az eltávolított stapes talpakat azonnal 10%-os formalinban fixáltuk a további kísérletes munkához. Az otosclerosis és a nem-otosclerosis stapes fixációkat posztoperatív szövettani vizsgálattal (hagyományos haematoxylin-eozin festés) különítettük el egymástól. A nem-otosclerosis stapes fixációval jellemzett betegek átlagéletkora 35,47 év (n=30; tartomány: -19-57 év) volt, az otosclerosis stapes fixációval jellemzett betegek átlagéletkora pedig 39,17 év (n=21; tartomány: -23-62 év) volt. A stapes fixáció klinikai diagnóziát otoszkópos, audiometriás és tympanometriás vizsgálatok segítségével állapítottuk meg. Az 1000 Hz-es frekvencián mért csont-lég köz értéke legalább 30 dB volt. A tympanogramok a legtöbb esetben (>90%) As-típusú (A-shallow) voltak. Egyetlen beteg sem emlékezett kanyaróvírus fertőzésre gyermekkorából, míg 17 esetben a vakcináció dokumentált volt (1969 után születettek). Ebben a kísérletben az ELISA vizsgálatokhoz a fent említett betegek szérum mintáit használtuk fel.

2. TNF- α receptorok (TNFRI/II) expressziójának vizsgálata otosclerosis szövetekben (immunhisztokémia, haematoxylin-eozin festés).

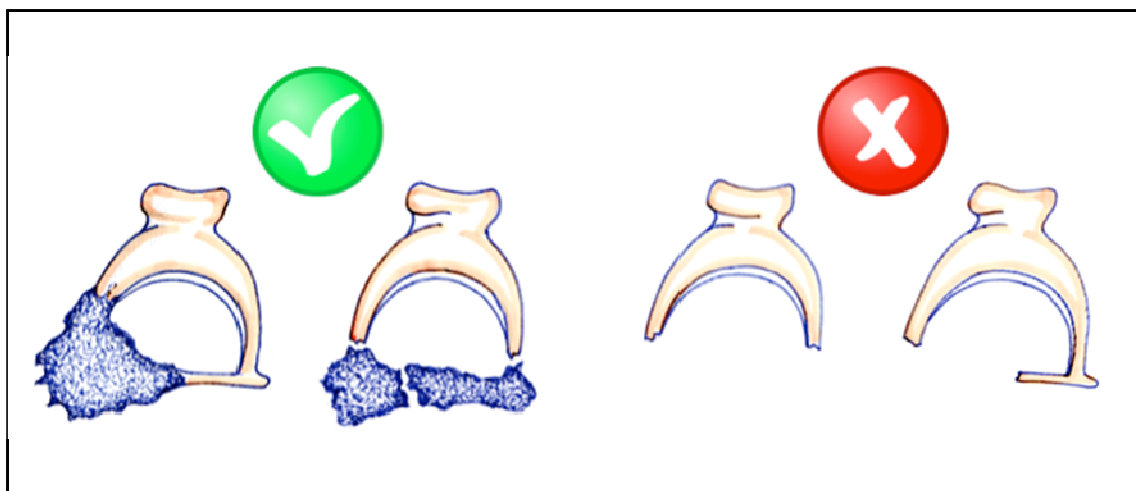
A második kísérletben nyolcvan stapes talpat használtunk fel (n=80; férfiak=29, nők=51), amelyeket szintén klinikailag stapes fixációval jellemzett betegekből távolítottak el. Az eltávolított stapes talpakat azonnal 10%-os

formalinban fixáltuk a további kísérletes munkához. A betegek átlagéletkora 39,41 év volt (tartomány: -17-71 év). A mintákat egy nagyobb készletből (n=384) választottuk ki szövettani vizsgálatok alapján, annak megfelelően, hogy negyven *otosclerosis* (n=40) és negyven *nem-otosclerosis* (n=40) mintán végezhesük el kísérleteinket. A stapes fixáció klinikai diagnóziát otoszkópos, audiometriás és tympanometriás vizsgálatok segítségével állapítottuk meg. Az 1000 Hz-es frekvencián mért csont-lég köz értéke minden esetben elérte, vagy meghaladta a 30 dB-t. A klinikai stapes fixációk megközelítőleg az esetek kétharmadában kétoldalinak bizonyultak, de betegenként csak egy stapest vizsgáltunk, mert ebben az időszakban (2008 december – 2009 február) csak egyoldali stapedectomiákat végeztek az esetek döntő többségében.

3. Apoptózis markerek (hCIAP1, hCIAP2, Granzyme- β) kifejeződésének vizsgálata otosclerosisos szövetekben (immunhisztokémia, haematoxylin-eozin festés).

A harmadik kísérletben negyvennégy (n=44; férfiak=20, nők=24) stapes talpat vetettünk alá szövettani vizsgálatnak, melyek közül negyvenet (n=40; férfiak=17, nők=23) stapedectomiával távolítottak el a betegekből stapes ankylosis miatt. A stapes fixációban szenvedő betegek átlagéletkora 42,19 év volt (tartomány: -21-67 év). A felhasznált mintákat egy nagyobb készletből (n=217) választottuk ki, a minták szövettani osztályozását követően. A szelekcióval kisebb *otosclerosis* és *nem-otosclerosis* reprezentatív csoportokat szerettünk volna létrehozni. A részlegesen eltávolított és összetört stapes talpakat kizártuk ebből a tanulmányból, csak olyan fragmentált mintákat használtunk fel, amelyek rekonstruálhatóak voltak az orientáció és a beágyazás során. Mindezzel törekedtünk a teljes stapes minták vizsgálatára. Ezen kritériumoknak 177 minta felelt meg, amelyek közül 124 klinikailag otosclerosisosnak bizonyult, de csak 53 minta esetében volt szövettani vizsgálattal is igazolható az otosclerosis diagnózisa. A stapes fixáció klinikai diagnóziát otoszkópos, audiometriás és tympanometriás vizsgálatok segítségével állapítottuk meg. Az 1000 Hz-en mért csont-lég köz érték legalább 30 dB volt. A tympanogramok A-típusúak (23%) vagy As-típusúak (73%) voltak. A klinikai stapes fixációk megközelítőleg az esetek kétharmadában kétoldalinak bizonyultak, de betegenként csak egy stapest vizsgáltunk, mert a

mintagyűjtési periódus alatt csak egyoldali stapedectomiákat végeztek az esetek döntő többségében. Négy cadaver stapes talpat (n=4; férfiak=3, nők=1) használtunk fel negatív kontrollként, amelyeket olyan elhunytakból távolítottak el a halál beállta után (24 órán belül), akik nem szenvedtek semmilyen fülészeti megbetegedésben. A negatív kontrol minták átlagéletkora 53,2 év (tartomány: - 48-63) év volt.



5. ábra: a stapes minták kiválasztásának morfológiai szempontjai.

A minták összegyűjtése és feldolgozása során minden esetben a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (TUKEB) hatályos előírásainak megfelelően jártunk el, a kísérletes munkát a bizottság (ETT-TUKEB/2008-113-547/89) engedélyével végeztük el. A minták összegyűjtésében a PTE, ÁOK Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikája (Pécs), a SZTE, ÁOK Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikája (Szeged), valamint a Bajcsy-Zsilinszky Kórház Fül-Orr-Gégészeti Osztálya (Budapest) voltak együttműködő partnereink.

SZÖVETTANI VIZSGÁLATOK

A szövettani vizsgálatokhoz felhasznált műtétilag eltávolított stapes mintákat az eltávolítást követően azonnal 10%-os pufferelt formalinba helyeztük (fixálás 7 napon keresztül). Ezt követően a csontokat 0,5 M-os nátrium-EDTA (etilén-diamino-tetraacetát, 72 órán keresztül) oldattal dekalcináltuk. A mintákat 10%-os analitikai tisztaságú zselatinba (Sigma-Aldrich, USA) ágyasztuk (24 óra, 56°C), majd a lehűtött zselatinos blokkokat 4%-os

paraformaldehid oldatban újrafixáltuk (24 óra). Két órán át krioprotekciót végeztünk 20%-os szacharóz oldatban, majd a zselatinos blokkokból kriosztát segítségével (MNT cryomicrotome, Slee, Mainz, Germany) 10µm vastagságú úszó metszeteket készítettünk, amelyeket 0,3%-os Na-azid tartalmú PBS-ben (Phosphate Buffered Saline) tároltunk a felhasználásig 4°C-os hőmérsékleten. Az elkészült metszeteket többféle módszerrel is vizsgáltuk, ennek megfelelően többféleképpen használtuk fel a metszeteket: 1; hagyományos haematoxilin-eozin festés; 2; nukleinsav extrakció, amely a kanyaróvírus- specifikus RT-PCR reakciók és a CD46- specifikus RT-PCR reakciók, valamint az ezt követő restrikciós tipizálás kivitelezéséhez volt szükséges; 3; immunhisztokémiai vizsgálatok. Az úszó metszeteket a tárgylemezre úsztatva és rászárítva elvégeztük azok haematoxilin-eozin festését, hogy az otosclerosisos és nem-otosclerosisos stapes fixációkat egymástól elkülöníthessük. A szövettani diagnózis felállításához hagyományos fénymikroszkópos (Axioskop2 MOT Zeiss, Jena, Germany) vizsgálatot végeztünk, a kapott eredményeket „jpeg” fájlformátumban digitálisan is archiváltuk.

Az otosclerosis szövettani diagnózisának megállapításakor az alábbi kritériumokat vettük figyelembe:

1; *Aktív otosclerosis*: basophil festődést mutató szabálytalan, fonatos csontszerkezet, erősen megvastagodott stapes talp; hypervascularizatio, többretegű endothelsejt proliferációval a marginális zónában; a góciókban nagyszámú osteoclast, osteoblast, osteocyta. Az osteoclastok több sejtmaggal rendelkeznek, és az osteolyticus Howship lacunákban találhatóak (103).

2; *Inaktív otosclerosis*: a szövettani képet a lamelláris csontszerkezet uralja, amelynél már kevésbé jellemző a fonatos mintázat; az otosclerosisos fókuszok eozinophilen festődnek; a hypervascularizatio megfigyelhető, de jelentősen csökkent az osteocyták száma, az osteoclastok és osteoblastok pedig csaknem teljesen eltűntek (103).

NUKLEINSAV EXTRAKCIÓ ÉS A KANYARÓVÍRUS GENOM KIMUTATÁSA RT-PCR TECHNIKÁVAL

A teljes RNS mennyiséget kivontuk a homogenizált metszetekből TRIReagent (Sigma-Aldrich, USA) segítségével. A nukleinsav -extrakció során mindenben a gyártó utasítása szerint jártunk el. A kanyaróvírus genom kimutatására az ssRNS szekvencia egy 440 bázispár hosszúságú szegmentumát használtuk, ezt a szakaszt amplifikáltuk seminested RT-

PCR segítségével. A cél szekvencia 5'-3' irányban a vírusgenom 1091-1531 nukleotidjaiból állt. Az RT-PCR során rTth (Recombinant *Thermus thermophilus*, Applied Biosystems, USA) reverz transzkriptáz enzimet alkalmaztuk. Az RT lépésben MV2 és MV3 nukleoprotein RNS- specifikus primereket alkalmaztunk. A vírus kontamináció kiküszöbölésére RNS-mentes negatív kontrollokat használtunk. A keletkezett cDNS-t a seminested lépésben Taq-polimeráz (Sigma-Aldrich, USA) enzim alkalmazásával tovább amplifikáltuk. Ebben a lépésben két újabb nukleoprotein RNS- specifikus primer kombinációt alkalmaztunk MV3-MV4 és MV2-NP14. A felhasznált primerek főbb jellemzőit az 1. táblázatban foglaltuk össze. A kontamináció megelőzésére cDNS-mentes negatív kontrollokat is beállítottunk. Az otosclerosis minták pozitív kontrolljaként élő attenuált *Edmonston* és *Schwartze*-típusú kanyaróvírus törzseket használtunk, amelyeket a hazánkban is forgalomban lévő MMR vakcinákból vontunk ki. Negatív kontrollként a fent említett klinikai kontroll mintákat alkalmaztuk. A kanyaróvírus kimutatás megerősítésére a mintáinkban emberi RNS kimutatását is elvégeztük. Erre a feladatra a riboszómális RNS-t célzó h36B4+ és h36B4- celluláris kontroll primereket alkalmaztuk. Az RT-PCR során az EA-RT (Enhanced Avian Reverse Transcriptase, Sigma Aldrich, USA) enzimet alkalmaztuk. A keletkezett cDNS-t a Taq DNS-polimerázzal (Sigma-Aldrich, USA) tovább amplifikáltuk. A negatív celluláris kontroll eredményt adó mintákat kizártuk a további vizsgálatainkból. A reakció eredményességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (1,5%-os agaróz gél).

A reakció során a következő hőmérsékleti profilt alkalmaztuk:

RT- lépés:

Inkubáció 60°C-on 30 percen át, denaturáció 94°C-on 2 percen át (RT- reakció), 40 amplifikációs ciklus (denaturáció 94°C-on 30 másodpercig, primer annealáció: 62°C-on 1 percen keresztül) és a végső extenzió 60°C-on 7 percen át.

semi-nested PCR:

Denaturáció 95°C-on 2 percen át, 35 amplifikációs ciklus (denaturáció 96°C-on 20 másodpercig, primer annealáció 55°C-on 1 percig, primer extenzió 72°C-on 1,5 percen át).

1. táblázat: Kanyaróvírus specifikus RT-PCR primerek

Primer	Szekvencia (5'- 3')	Termék hossza (bp)	Annealációs hőmérséklet
<i>Kanyaró (NP) specifikus primerek</i>			
<i>Külső kör</i>			
MV2 (-)	GTTCTTCCGAGATTCCTGCCA	381	62°C
MV3 (+)	GCATCTGAACTCGGTATCAC		
<i>Belső kör</i>			
MV3 (+)	GCATCTGAACTCGGTATCAC	231	55°C
MV4 (-)	AGCTCTCGCATCTGCTCT		
MV2 (-)	GTTCTTCCGAGATTCCTGCCA	221	55°C
NP14 (+)	GCAAGGAAGATAGGAGGGTC		
<i>Emberi celluláris kontroll primerek</i>			
H36B4+ (+)	AGATGCAGCAGATCCGCAT	150	55°C
H36B4- (-)	ATATGAGGCAGGAGTTTCTCCAG		

CD46 VARIÁNSOK KIMUTATÁSA RT-PCR TECHNIKÁVAL

A CD46 mRNS variánsok elkülönítésére tervezett RT-PCR primerjei közül a 'sense' irányultságú CD46Kfor az 5-ös és a 6-os exon határát átfedve, míg az 'antisense' irányultságú CD46Krev a 14-es exonhoz kötődött a reakció során. Az exonhatárookra tervezett első primer segítségével biztosítottuk, hogy kizárólag az érett, az alternatív splicing-on már átesett mRNS amplifikálódott. Mivel a primereket konzervatív, minden variánsban megtalálható exonokra terveztük, a módszerrel valamennyi jelen lévő variáns mRNS-ét detektálhattuk. A cDNS PCR során CD46Bfor, és CD46Brev primereket alkalmaztuk. A reakció során felhasznált primerek jellemzőit a 2. táblázat tartalmazza. Az RT lépés során eAMV RT (enhanced avian myeloblastosis virus reverse transcriptase) enzimet (Sigma-Aldrich, USA) használtuk. A cDNS-PCR-t a JumpStart™ Accu Taq™ LA DNA polymerase enzim (Sigma-Aldrich, USA) alkalmazásával végeztük el. A reakció eredményességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A keletkezett amplimerek elkülönítését agaróz gélelektroforézissel, és poliakrilamid gélelektroforézissel egyaránt elvégeztük, mert

poliakrilamid gélen jobban elkülönültek az egyes izotípusokat reprezentáló amplimer csíkok. Azonban az egyes CD46 variánsok molekulásúly alapján nem voltak egyértelműen megfeleltethetőek az egyes izotípusoknak, ezért volt szükség egy a variánsok meghatározását célzó módszer alkalmazására.

A reakció során a következő hőmérsékleti profilt alkalmaztuk:

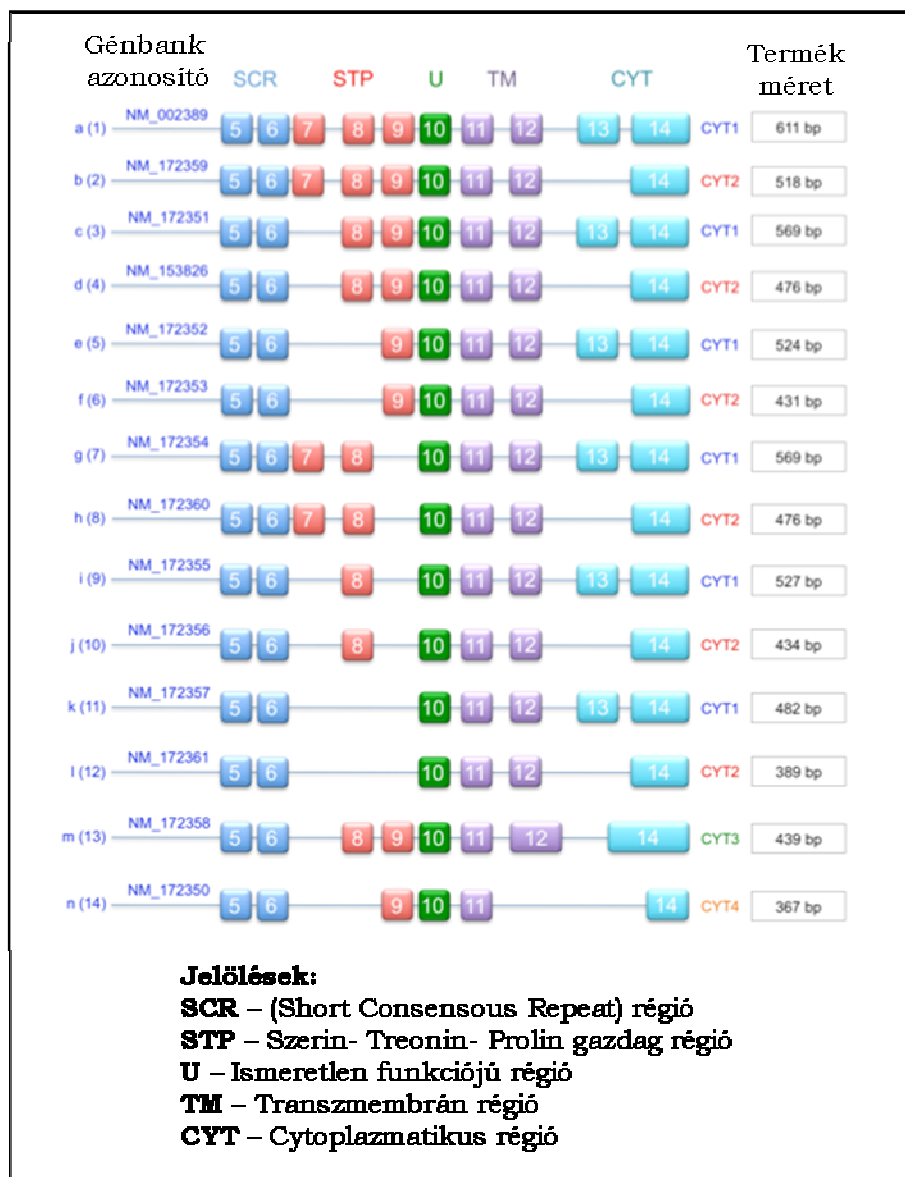
RT lépés:

Inkubáció 75°C-on 10 percen keresztül, amikor a minták és a primerek együtt inkubálódnak, a primerek nélküli master mix-et csak ezután adjuk hozzá, majd 48°C-on 20 percig, ezt követően pedig 50°C-on 30 percig inkubáljuk a mintákat.

cDNS PCR:

94°C-on denaturálás 2 percen át, 35 amplifikációs ciklus (denaturáció 94°C-on 15 másodpercig, primer annealáció 60°C-on 30 másodpercig, primer extenzió 68°C-on 1 percig).

A CD46 –specifikus RT-PCR során keletkező várható (ismert CD46 variánsok) amplimerek szerkezetét, és az egyes amplimerek méretét a 6. ábrán foglaltuk össze.



6. ábra: A CD46 mRNS variánsok sematikus szerkezete az RT-PCR során keletkező, számított termékméretekkel. A szerkezeti diagramokon a kis téglalapokban látható számok jelzik az egyes exonok sorszámaát. CYT1, CYT2, CYT3, CYT4 a különböző típusú citoplazmatikus doméneket jelölik, amelyek a CD46 variánsokra jellemzőek. A fontosabb régiókat (SCR, STP, U, TM, CYT) külön jelöltük.

2. táblázat: CD46 specifikus RT-PCR primerek

Primer	Szekvencia (5'-3')	Annealációs Hőmérséklet
CD46 specifikus primerek		
Külső kör		
CD46Kfor (+)	GAGTGTAAAGTGGTCAAATGTCG	75°C
CD46Krev (-)	GGAGTGGTTGATTTAGTCTGGTAA	
Belső kör		
CD46Bfor (+)	TCGATGGCAGCGACACAA	60°C
CD46Brev (-)	GGTAAGTGGCATATTCAGCTCCA	

CD46 AMPLIMEREK TISZTÍTÁSA POLIAKRILAMID GÉLBŐL

A poliakrilamid gélelektroforézist követően szikepenge segítségével kivágtuk az amplimer csíkokat, majd ezt követően a géldarabokat 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe helyeztük, és 300 µl elúciós puffert (0,5M ammónium-acetát; 1mM EDTA, pH 8,0) adtunk a mintákhoz, majd egy éjszakán keresztül 37°C-os hőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően centrifugálással különítettük el egymástól a felülúszót és a géldarabokat, majd a DNS tartalmú felülúszót tiszta Eppendorf csövekbe pipettáztuk át. A DNS-t kétszeres mennyiségű 100%-os etanollal precipitáltuk -70°C-os hőmérsékleten 10 percig, majd centrifugáltuk (5 perc, 4°C, 13000g). Majd 100µl Tris-EDTA (TE, pH 7,5) pufferben felvettük az üledéket, amit két és félszeres mennyiségű 96%-os etanollal, és tizednyi térfogatú 2,5 M-os Na-acetáttal újból precipitáltunk. A precipitációt követően a mintákat centrifugáltuk (5 perc, 4°C, 13000g). A keletkezett pelletet 70%-os etanollal mostuk, és 37°C-os hőmérsékleten szárítottuk. A szárítást követően a mintákat 20-20µl TE-ben oldottuk vissza.

AZ ELKÜLÖNÍTETT CD46 VARIÁNSOK RESTRIKCIÓS ANALÍZISE

A gélelektroforézissel elkülönített CD46 variánsoknak megfelelő amplimereket miután a gélből visszanyertük, restrikciós analízissel azonosítottuk. Erre azért volt szükség, mert az egyes amplimercsíkok molekulaméret alapján nem voltak egyértelműen megfeleltethetők egy-egy variánsnak (sok hasonló, közel azonos molekulaméretű variáns van, ami a 3. táblázat adataiból is látszik). A restrikciós enzimek kiválasztása során az

elsődleges szempontunk az volt, hogy a CD46 gén hipervariábilis régiójában kizárólag egyetlen felismerőhellyel rendelkezzenek. Ennek alapján a következő enzimeket alkalmaztuk a restrikciós analízis során: 1. *Hinf*I (7-es exon); 2. *Acc*I (8-as exon); *Stu*I (9-es exon); *Hpy*CH4V (12-es exon); *Bsa*I (13-as exon). Az egyes restrikciós enzimek felsimerő-és hasítási helyeit a 7. ábrán tüntettük fel. Minden cDNS mintát emésztettük a fent említett restrikciós enzimekkel (48°C, 24h). A restrikciós hasítások eredményét a hasított cDNS amplimerek agaróz gélelektroforézisével tettük láthatóvá. A restrikciós tipizálás eredményeként a CD46 izotípusoknak megfelelő amplimerek azonosíthatóvá váltak a hasítási mintázatuk valamint a molekulaméretük alapján, így megfeleltethetőek a korábban már leírt tizennégy izoformának. A tizennégy CD46 variáns fontosabb jellemzői a 3. táblázatban láthatóak.

3. táblázat: A lehetséges CD46 amplimerek molekulamérete, és hasítási mintázata.

CD46 izotípus	Amplimer hossz	Az izotípust hasítani képes endonukleázok
n	227bp	<i>Stu</i> I
l	249bp	<i>Hpy</i> CH4V
f	291bp	<i>Stu</i> I, <i>Hpy</i> CH4V
j	294bp	<i>Acc</i> I, <i>Hpy</i> CH4V
m	299bp	<i>Acc</i> I, <i>Stu</i> I, <i>Hpy</i> CH4V
d	336bp	<i>Acc</i> I, <i>Stu</i> I, <i>Hpy</i> CH4V
h	336bp	<i>Hinf</i> I, <i>Acc</i> I, <i>Hpy</i> CH4V
k	342bp	<i>Hpy</i> CH4V, <i>Bsa</i> I
b	378bp	<i>Hinf</i> I, <i>Acc</i> I, <i>Stu</i> I, <i>Hpy</i> CH4V
e	384bp	<i>Stu</i> I, <i>Hpy</i> CH4V, <i>Bsa</i> I
i	387bp	<i>Acc</i> I, <i>Hpy</i> CH4V, <i>Bsa</i> I
c	429bp	<i>Acc</i> I, <i>Stu</i> I, <i>Hpy</i> CH4V, <i>Bsa</i> I
g	429bp	<i>Hinf</i> I, <i>Acc</i> I, <i>Hpy</i> CH4V, <i>Bsa</i> I
a	471bp	<i>Hinf</i> I, <i>Acc</i> I, <i>Stu</i> I, <i>Hpy</i> CH4V, <i>Bsa</i> I



7. **ábra:** A CD46 molekula hipervariábilis régiójának kódolásáért felelős mRNS (messenger RNS) szekvenciája, valamint az erre a régióra specifikus endonukleázok felismerési-és hasítási helyei. Az aláhúzott nukleotid szekvenciák a CD46 specifikus RT-PCR-hez felhasznált primerek (CD46Kfor, CD46Krev) annealációs helyeit jelzik. A piros nyilak jelölik a mRNS exonjainak kezdő nukleotidjait. A színes téglalapok a restrikciós enzimek hasítási helyeit jelölik. A molekula hipervariábilis régiójában a *HinfI*, *AccI*, *StuI*, *HpyCH4V* és a *BsaI* endonukleázok rendelkeznek specifikus felismerő-és hasítási hellyel. Az ábra forrása: Csomor P., Szalmás A., Kónya J., Sziklai I., Karosi T. Restriction analysis of otosclerosis-associated CD46 splicing variants. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 2010; **267**(2):219-226. (A szerzők hozzájárulásával)

KANYARÓVÍRUS- SPECIFIKUS ELISA

A klinikailag stapes fixációval jellemzett betegek műtét előtt nyert szérum mintáit -70°C -os hőmérsékleten tároltuk a feldolgozásig. A kanyaróvírus- ellenes IgG és IgA szinteket egy kanyaróvírus specifikus ELISA-kit segítségével határoztuk meg, amelyet a gyártó ajánlása (Immuno Biological Laboratories, IBL-Hamburg, Germany) szerint alkalmaztunk. A vizsgálatok előtt az immunglobulin szintek meghatározásához kalibrációs görbét készítettünk ismert kanyaróvírus- ellenes immunglobulin standardok felhasználásával. Az ELISA-reader készülékben 450 nm-es hullámhosszúságú fényt alkalmaztunk, míg referencia hullámhosszként a 620 nm-es értéket választottuk ki. A kanyaróvírus-ellenes immunglobulin szintet (IgG és IgA) 12 IU/ml felett pozitívnak tartottuk, a szürke (cut-off) zónának a 8 és 12 IU/ml közötti értékeket tekintettük, míg a 8 IU/ml alatti immunglobulin szinteket egyértelműen negatív eredményként értékeltük. Negatív kontrollként a nem-otosclerosis (szöveti diagnózis alapján) stapes fixációban szenvedő betegek szérum mintáit alkalmaztuk.

TNF- α RECEPTOR I/II- SPECIFIKUS IMMUNOFLUORESZCENS VIZSGÁLATOK (IFA)

A TNF- α receptor I és II -specifikus immunofluoreszcens vizsgálatokhoz felhasznált, műtéileg eltávolított mintákat azonnal 10%-os pufferelt formalinban fixáltuk (7 nap), majd dekalcináltuk 0,5 M-os nátrium-EDTA (etilén-diamino-tetraacetát) oldattal 72 órán keresztül 4°C -os hőmérsékleten. A dekalcinált mintákat 15%-os tisztított zselatinba (Sigma-Aldrich, USA) ágyaztuk (24 óra, 56°C), majd a lehűtött és megformázott zselatinos blokkokat 4%-os paraformaldehid oldattal újrafixáltuk (24 óra, 20°C). Az elkészült, fixált blokkokon krioprotekciót végeztünk 20%-os szacharóz oldat segítségével (2 óra, 4°C). Az ily módon előkészített mintákból 10 μm -es vastagságú úszó metszeteket készítettünk kriosztát segítségével (MNT cryomicrotome, SLEE, Mainz, Germany) -40°C -os hőmérsékleten. Az elkészült metszeteket 0,02% Na-azidot tartalmazó 0,1 M-os PBS-ben (Phosphate Buffered Saline) tároltuk 4°C -os hőmérsékleten az immunfluoreszcens reakció kivitelezéséig. Minden egyes mintából kiválasztottunk egymás utáni metszeteket, amelyeket mind hagyományos haematoxylin-eozin festéssel, mind a TNF- α receptor I/II- specifikus immuno-assay-el elemeztünk.

A TNF- α receptor I/II specifikus immuno-assay kivitelezése:

Blokkolás:

A reakcióhoz kiválasztott metszeteket 0,2 mol/L PBS tartalmú Protein Block (Biogenex Laboratories Inc, San Ramon, CA, USA) oldattal mostuk 20 percen át 20°C-os hőmérsékleten, amely tartalmaz: 1% szarvasmarha szérum albumint, 0,09% nátrium-azidot és 0,1% Tween-20 detergenst.

Primer antitestek:

A blokkolt metszeteket ezek után együtt inkubáltuk 100 μ l térfogatú, 0,02% nátrium-azidot tartalmazó, 0,005 mg/ml koncentrációjú poliklonális kecskében előállított anti-humán-TNFR1/TNFRSF1A specifikus primer antitest (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) oldattal folyamatos rázatás mellett 24 órán keresztül 20°C-os hőmérsékleten. Az első primer antitest kötődését követően mostuk a metszeteket 0,2 mol/L koncentrációjú PBS-sel. Mintáinkat ezt követően együtt inkubáltuk 100 μ l térfogatú, 0,02% nátrium-azidot tartalmazó, 0,005 mg/ml koncentrációjú monoklonális egér hibridóma sejtvonalban előállított anti-humán-TNFR2/TNFRSF1B specifikus primer antitest (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) oldattal folyamatos rázatás mellett 24 órán keresztül 20°C-os hőmérsékleten. A metszeteket ismételten mostuk 0,2 mol/L koncentrációjú PBS-sel.

Secunder antitestek:

A mintáinkat együtt inkubáltuk folyamatos rázatás mellett 12 órán keresztül 20°C-os hőmérsékleten 50 μ l térfogatú, 0,02% nátrium-azidot tartalmazó, 0,005 mg/ml koncentrációjú NorthernLightsTM számban termeltetett anti-kecske immunglobulin G (IgG) secunder antitest oldattal (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), amelyben az antitestek az NL-493 jelű flouorokrómmal voltak jelölve. A metszeteket ismételten mostuk 0,2 mol/L koncentrációjú PBS-sel. Végül a mintáinkat 50 μ l térfogatú, 0,02% nátrium-azidot tartalmazó, 0,005 mg/ml koncentrációjú NorthernLightsTM számban termeltetett anti-egér IgG secunder antitest oldattal (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) inkubáltuk együtt folyamatos rázatás mellett 12 órán keresztül 20°C-os hőmérsékleten, amelyben az antitestek az NL-637 jelű fluorokrómmal voltak jelölve. A metszeteket végül 0,2 mol/L koncentrációjú PBS-sel mostuk.

Az immuno-assay során az összes inkubációt steril nedves kamrában végeztük el, a reakciók során felhasznált összes primer és secunder antitest az R&D Systems-től származott. Az antitestek aspecifikus kötődésének kizárására külön kísérleteket nem végeztünk, mert a gyártótól kizárólag olyan antitesteket rendeltünk, amelyek tesztelve voltak a kísérlet szempontjából esetlegesen zavaró keresztreakciókra. A gyártó ezeket a paramétereket direct ELISA-val és Western-blot assay-el ellenőrizte minden antitest esetében, s a kapott eredményeket feltüntette az adott termék adatlapján.

Lefedés:

Az immunreakcióhoz felhasznált metszeteket minden esetben UV-transzparens PromoFluor Antifade Reagent-tel (Promocell, Heidelberg, Germany) fedtük.

Archiválás:

Az immunreakciók kiértékeléséhez szükséges digitális felvételeket a különböző fluorokrómoknak megfelelő hullámhosszú gerjesztő fénysugár alkalmazásával készítettük el egy fluoreszcens mikroszkóp konfiguráció segítségével (Axioskop2 MOT Zeiss, Jena, Germany). Az NL-493 esetében 510 nm-es hullámhosszon és az NL-637 esetében pedig 650 nm-es hullámhosszon készítettük el a digitális felvételeket. Az expozíciós idő minden esetben a 90 és 130 millisecondum közötti tartományba esett. Az elkészült képeket „jpeg” fájlformátumban digitálisan archiváltuk (Axioskop2 MOT, Axiovision 4.0; Zeiss, Jena, Germany).

HCIAP1/2 ÉS GRANZYME B- SPECIFIKUS IMMUNOFLUORESzcENS VIZSGÁLATOK (IFA)

A hCIAP1/2 és Granzyme- β -specifikus immunfluoreszcens vizsgálatokhoz felhasznált, műtétileg eltávolított mintákat azonnal 10%-os pufferelt formalinban fixáltuk (7 nap), majd dekalcináltuk 0,5 M-os nátrium-EDTA (etilén-diamino-tetraacetát) oldattal 72 órán keresztül 4°C-os hőmérsékleten. A dekalcinált mintákat 15%-os tisztított zselatinba (Sigma-Aldrich, USA) ágyaztuk (24 óra, 56°C), majd a lehűtött és formázott zselatinos blokkokat 4%-os paraformaldehid oldattal újrafixáltuk (24 óra, 20°C). Az elkészült, fixált blokkokon krioprotekciót végeztünk 20%-os szacharóz oldat segítségével (2 óra, 4°C). Az ily módon előkészített mintákból 10 μ m-es vastagságú úszó metszeteket készítettünk kriosztát segítségével (MNT cryomicrotome, Slee, Mainz, Germany) -40°C-os hőmérsékleten. Az

elkészült metszeteket 0,02% Na-azidot tartalmazó 0,1 M-os PBS-ben (Phosphate Buffered Saline) tároltuk 4°C-os hőmérsékleten az immunfluoreszcens reakció kivitelezéséig. Minden egyes mintából kiválasztottunk egymás utáni metszeteket, amelyeket mind hagyományos haematoxylin-eozin festéssel, mind a hCIAP1/2 és Granzyme- β -specifikus immuno-assay-el elemeztünk.

A hCIAP1/2 és Granzyme- β -specifikus immuno-assay kivitelezése:

Blokkolás:

A reakcióhoz kiválasztott metszeteket 0,2 mol/L PBS tartalmú Protein Block (Biogenex, San Francisco, CA, USA) oldattal mostuk 20 percen át 20°C-os hőmérsékleten, amely tartalmaz: 1% szarvasmarha szérum albumint, 0,09% nátrium-azidot és 0,1% Tween-20 detergenst.

Primer antitestek:

A blokkolt metszeteket ezek után együtt inkubáltuk 100 μ l térfogatú, 0,02% nátrium-azidot tartalmazó, 0,005 mg/ml koncentrációjú poliklonális kecskében előállított anti-humán hCIAP1-specifikus primer antitest (R&D Systems, Birmingham, AL, USA) oldattal folyamatos rázatás mellett 24 órán keresztül 20°C-os hőmérsékleten. Az első primer antitest kötődését követően mostuk a metszeteket 0,2 mol/L koncentrációjú PBS-sel. Mintáinkat ezt követően együtt inkubáltuk 100 μ l térfogatú, 0,02% nátrium-azidot tartalmazó, 0,005 mg/ml koncentrációjú poliklonális, számarban előállított anti-humán hCIAP2-specifikus primer antitest (R&D Systems, Birmingham, AL, USA) oldattal folyamatos rázatás mellett 24 órán keresztül 20°C-os hőmérsékleten. A metszeteket ismételten mostuk 0,2 mol/L koncentrációjú PBS-sel. Az öblítést követően a metszeteket együtt inkubáltuk 100 μ l térfogatú, 0,02% nátrium-azidot tartalmazó, 0,02 mg/ml koncentrációjú monoklonális egér hibridóma sejtvonalban előállított anti-humán granzyme- β -specifikus primer antitest (R&D Systems, Birmingham, AL, USA) oldattal folyamatos rázatás mellett 24 órán keresztül 20°C-os hőmérsékleten. A metszeteket ismételten mostuk 0,2 mol/L koncentrációjú PBS-sel.

Secunder antitestek:

A mintáinkat együtt inkubáltuk folyamatos rázatás mellett, 12 órán keresztül, 20°C-os hőmérsékleten, 50 μ l térfogatú, 0,02% nátrium-azidot tartalmazó, 0,005 mg/ml koncentrációjú NorthernLightsTM számar anti-kecske immunglobulin G (IgG) secunder antitest oldattal

(R&D Systems, Birmingham, AL, USA), amelyben az antitestek az NL-493 jelű flourokrómmal voltak jelölve. A metszeteket ismételten mostuk 0,2 mol/L koncentrációjú PBS-sel. Az öblítést követően mintáinkat 50 µl térfogatú, 0,02% nátrium-azidot tartalmazó, 0,005 mg/ml koncentrációjú NorthernLights™ kecske anti-szamar IgG secunder antitest oldattal (R&D Systems, Birmingham, AL, USA) inkubáltuk együtt folyamatos rázatás mellett 12 órán keresztül, 20°C-os hőmérsékleten, amelyben az antitestek az NL-557 jelű fluorokrómmal voltak jelölve. A metszeteket ismételten mostuk 0,2 mol/L koncentrációjú PBS-sel. Végül a mintáinkat 50 µl térfogatú, 0,02% nátrium-azidot tartalmazó, 0,005 mg/ml koncentrációjú NorthernLights™ szamar anti-egér IgG secunder antitest oldattal (R&D Systems, Birmingham, AL, USA) inkubáltuk együtt folyamatos rázatás mellett, 12 órán keresztül, 20°C-os hőmérsékleten, amelyben az antitestek az NL-637 jelű fluorokrómmal voltak jelölve. A metszeteket mostuk 0,2 mol/L koncentrációjú PBS-sel.

Az immuno-assay során végrehajtott összes inkubációt steril nedves kamrában végeztük, a reakciók során felhasznált összes primer és secunder antitest az R&D Systems-től származott. Az antitestek aspecifikus kötődésének kizárására külön kísérleteket nem végeztünk, mert a gyártótól kizárólag olyan antitesteket rendeltünk, amelyek tesztelve voltak a kísérlet szempontjából esetlegesen zavaró keresztreakciókra. A gyártó ezeket a paramétereket direct ELISA-val és Western-blot assay-el ellenőrizte minden antitest esetében, s a kapott eredményeket feltüntette az adott termék adatlapján.

Lefedés:

Az immunreakcióhoz felhasznált metszeteket minden esetben UV-transzparens PromoFluor Antifade Reagent-el (Promocell, Heidelberg, Germany) fedtük.

Kiértékelés, archiválás:

Az immunreakciók kiértékeléséhez szükséges digitális felvételeket a különböző fluorokrómoknak megfelelő hullámhosszú gerjesztő fénysugár alkalmazásával készítettük el egy fluoreszcens mikroszkóp konfiguráció segítségével (Axioskop2 MOT Zeiss, Jena, Germany). Az NL-493 esetében 510 nm-es hullámhosszon, az NL-557 esetében 574 nm-es hullámhosszon, az NL-637 esetében pedig 650 nm-es hullámhosszon készítettük el a digitális felvételeket. Az expozíciós idő minden esetben a 90 és 130 millisekundum közötti tartományba esett. Az elkészült képeket „jpeg” fájlformátumban digitálisan archiváltuk (Axioskop2 MOT, Axiovision 4.0; Zeiss, Jena, Germany). A felvételek alapján

szemikvantitatív analízist végeztünk az Axiovision 4.0 szoftver alkalmazásával, amelynél a relatív lumineszcenciát minden esetben mind a három különböző hullámhosszon adott jel alapján kalkuláltuk. Vizsgálódásunk középpontjában elsődlegesen a léziók centrális részén található, átlagosan 5-10 sejtet tartalmazó területek voltak, amelyeket 40x nagyítás mellett tanulmányoztunk.

EREDMÉNYEK

Eredményeinket a betegminták részletes ismertetésénél is használt felosztás szerint tárgyaljuk a továbbiakban, amelyek ebben a fejezetben is három jól elkülöníthető részre oszthatóak és megfeleltethetők azon három kísérletsorozatnak, amelyek a dolgozat gerincét képezik.

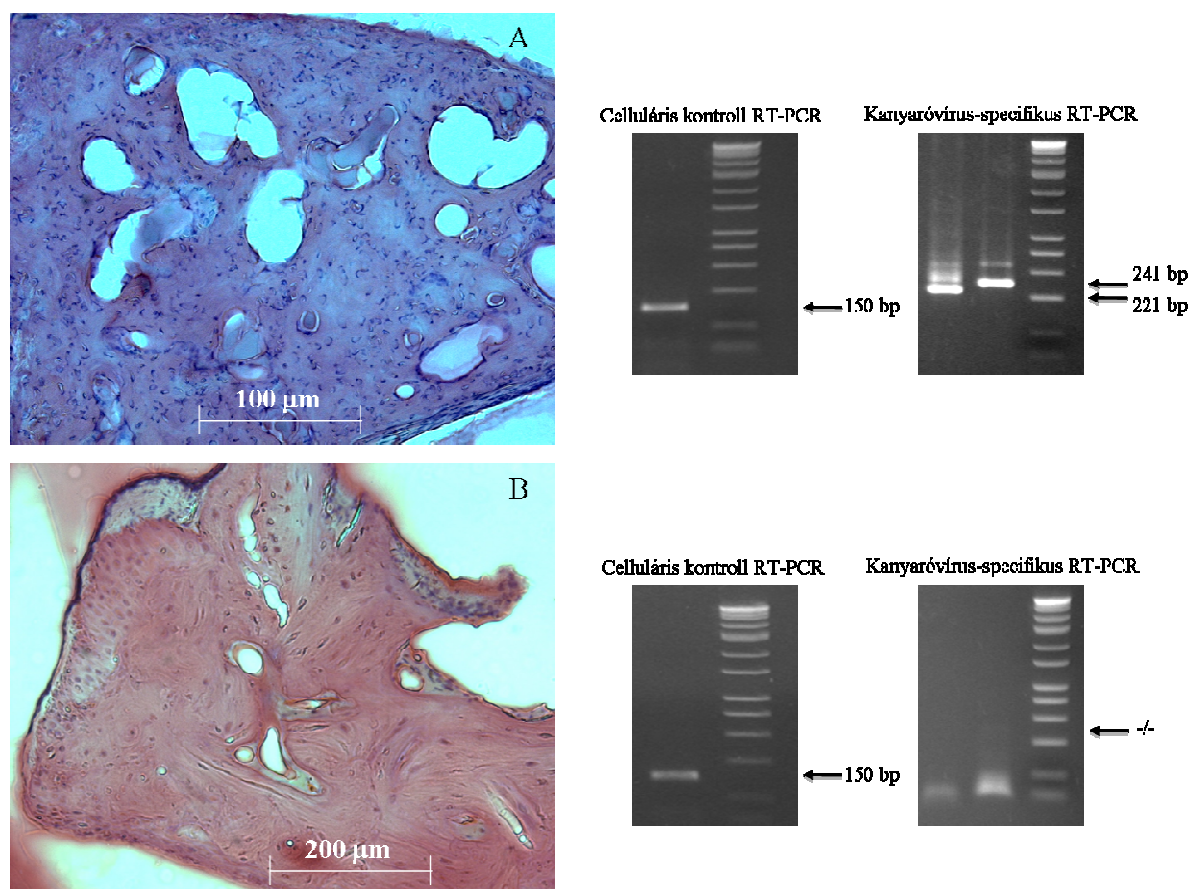
AZ OTOSCLEROSISHOZ KAPCSOLHATÓ CD46 IZOFORMÁK RESTRIKCIÓS ANALÍZISE

Szövettani diagnózis és a kanyaróvírus RNS kimutatása

A kísérlet során felhasznált stapes talpak szövettani vizsgálatának köszönhetően az otosclerosis korrekt szövettani diagnózisát 21 stapes ankylosis esetében tudtuk egyértelműen kimondani (8/A. ábra). Ezen minták közül 16 minta esetében az otosclerosisos gócok szövettanilag aktívnak bizonyultak, azonban 5 minta esetében szövettanilag inaktívak voltak. A szövettani vizsgálatok feltárták a 30 nem-otosclerosisos stapes fixáció esetében megjelenő stapediovestibuláris calcificációt, amelyet eozinophilen festődő extracelluláris mátrix állomány, csökkent cellularitás és hypovascularisatio kísért (8/B. ábra)

Az emberi riboszómális RNS-t mind az 51 vizsgált stapes talpból ki tudtuk mutatni a celluláris kontroll RT-PCR reakciók során. Ennek megfelelően minden mintánk alkalmas volt arra, hogy a fent említett vizsgálatok mellett elvégezzük a kanyaróvírus RNS jelenlétének kimutatását (RT-PCR), valamint a CD46 splicing variánsok kimutatását (RT-PCR) és azok restrikciós analízisét. Az elvégzett vizsgálatok során szoros összefüggést tapasztaltunk a csontban megfigyelhető csontléziók és a kanyaróvírus RNS-specifikus RT-PCR reakciók eredményei között. A kanyaróvírus nukleoproteint kódoló RNS minden esetben kimutatható volt azokban a mintákban, amelyek a szövettani vizsgálatok során otosclerosisosnak bizonyultak (n=21); (8/A. ábra). Az otosclerosisos csont szövettani képe reszorptív csont léziókkal, a nagyszámú osteoclastot, osteoblastot, fibroblasot és proliferáló endothelsejtet tartalmazó vasculáris és pseudovasculáris elemekkel jellemezhető (8/A. ábra) A vírusnegatív stapes talpaknál (n=30) minden esetben nem-otosclerosisos degeneratív megbetegedések álltak a stapes fixációk hátterében, amelyeket az otosclerosisától eltérő a pathogenezis

jellemez (8/B. ábra). A nem-otosclerosis stapes fixációk között az elváltozások háttérében annuláris calcificatio (n=19), globuláris fibrózis (n=7), és lymphocyta infiltráció (n=4) állt.



8. ábra: A kanyaróvírus nukleoprotein (NP) specifikus és a celluláris kontroll RT-PCR eredményei a szövettani sajátságokkal (haematoxylin-eozin festés) összefüggésben otosclerosis és nem-otosclerosis stapes talpak esetében. **A:** Aktív otosclerosis góc a stapes talp elülső pólusán, jellemző a hypercellularitás, a széles pseudovascularis terek, a basophil festődés. A celluláris kontroll RT-PCR pozitív eredményt adott, a kanyaróvírus nukleoprotein RNS kimutatása minden szövettanilag is otosclerosisosnak bizonyult minta esetében sikeres volt mindkét semi-nested primerpár (MV3-MV4; MV2-NP14) alkalmazásával. **B:** Annuláris stapediovestibularis calcificatio, amelyet csökkent cellularitás, és vascularisatio jellemez. A kóros csontremodelláló következtében kialakuló eosinophilen festődő osteoid állomány figyelhető meg. A celluláris kontroll RT-PCR sikeres volt, a kanyaróvírus kimutatása azonban az összes nem-otosclerosisos stapes fixáció esetében sikertelen volt.

Az ábra forrása: Csomor P., Szalmás A., Kónya J., Sziklai I., Karosi T. Restriction analysis of otosclerosis-associated CD46 splicing variants. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 2010; **267**(2):219-226.

(A szerzők hozzájárulásával)

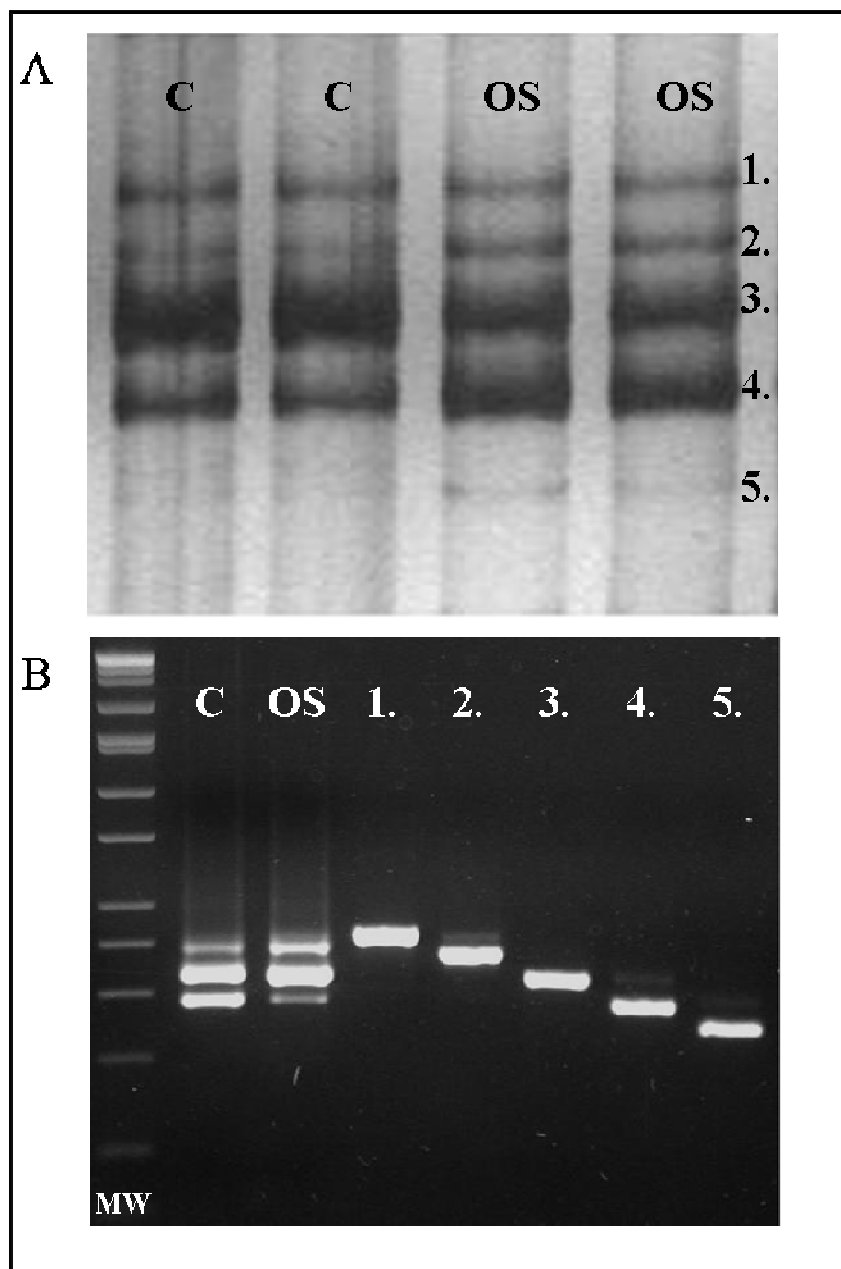
Kanyaróvírus specifikus ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay)

A kanyaróvírus- specifikus ELISA vizsgálatok statisztikailag szignifikáns eltérést mutattak ki a betegek szérumában tapasztalható kanyaróvírus -ellenes IgG szintek tekintetében az otosclerosis és a nem-otosclerosis stapes fixációk között. A kanyaró-ellenes ellenanyag (IgG) mennyisége szignifikánsan alacsonyabb (medián: 6,9 IU/ml) volt az

otosclerosisos betegek szérumban, a vírusnegatív, nem-otosclerosisos kontrollokhoz (medián: 142 IU/ml) képest. Tizenhét páciens volt a vizsgált beteganyagban, akik dokumentáltan részesültek kanyaróvírus-elleni vakcinációban. Érdekes, hogy ezek közül a betegek közül tizenegyen szenvedtek otosclerosisban, amely szövettanilag is igazolt volt, csontmintáikból kimutattuk a kanyaróvírus jelenlétét, valamint esetükben elégtelen szérumban kanyaró-ellenes IgG titert tapasztaltunk az ELISA vizsgálatok során (medián: 6,1 IU/ml). A további hat esetben a betegeknek nem-otosclerosisos stapes fixációja volt, és szeropozitívnak bizonyultak a kanyaróvírussal szemben (medián: 133 IU/ml).

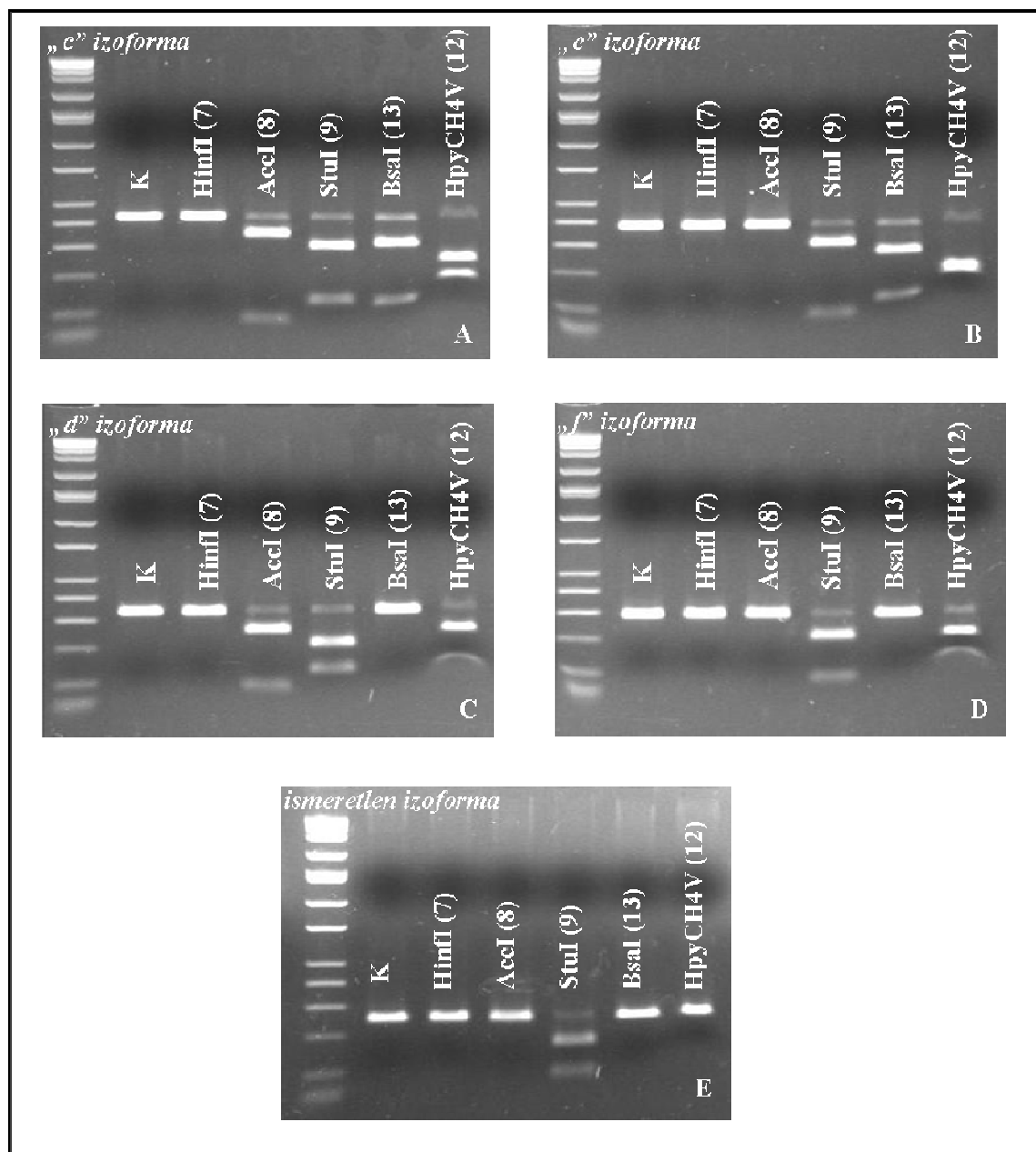
CD46 variánsok restrikciós analízise

Az otosclerosisos és a nem-otosclerosisos stapes fixációk is ugyanazon öt CD46 mRNS variáns együttes expressziójával jellemezhetőek, azonban ezek eltérő expressziós szinteket mutatnak a két csoportban. A variánsokat a molekulásúly szerinti eloszlásuk és a restrikciós analízis alapján azonosítottuk (9. ábra, 10. ábra). Minden mintánkban a „c”, „d”, „e”, „f”, és egy ezidáig ismeretlen rövidebb splicing variánst tudtunk kimutatni (9. ábra). Az ismeretlen rövid variáns alternatív splicing során keletkező mRNS-e csak a kilences exont tartalmazta a variábilis régióból. Az ismeretlen variáns expressziós mintázata megegyezik a már korábban leírt „n” variánsával, azonban molekulásúlyuk teljesen eltérő (10/E. ábra, 3. táblázat). Az öt különböző CD46 variáns relatív expressziós szintjeit denzitometriás mérések segítségével határoztuk meg. Az otosclerosisos minták esetében az „f” és az ismeretlen rövid variáns mutatott szignifikánsan emelkedett expressziót ellentétben a nem-otosclerosisos minták esetében tapasztalt eredményekkel (9. ábra). Ezek alapján az otosclerosis jellemezhető a CD46 variánsok egyedi expressziós mintázatával, amelyek relatív expressziós szintjeik alapján csökkenő sorrendbe rendezve a következők: f (4.), d (3.), e (2.), c (1.), és az ismeretlen (5.) variáns (9. ábra.). A nem-otosclerosisos stapes fixációkra jellemző CD46 izoformák relatív expressziós szintjeik alapján csökkenő sorrendben a következők: d (3.), f (4.), c (1.), e (2.), és az ismeretlen (5.) variáns (9. ábra). Ki kell emelnünk, hogy az ismeretlen (5.) variáns elhanyagolható mértékű expressziós szinteket mutatott a nem-otosclerosisos stapes fixációk esetében (9. ábra).



9. ábra: A különböző CD46 izoformák cDNS-einek elkülönítése SDS poliakrilamid gélelektroforézis segítségével (SDS-PAGE). **A:** az otosclerosis (OS) és a nem-otosclerosis (C) stapes talpak CD46 expressziós mintázata (inverz SDS-PAGE fevétel UV fény expozícióval). Ugyanazon öt CD46 variánst tudtuk detektálni az otosclerosis és a nem-otosclerosis mintákban is, azonban az izoformák relatív expressziós szintjei eltérőek. A variánsok koexpressziójának mintázata szoros összefüggést mutatott a minták szövettani leleteivel. A számok a CD46 mRNS specifikus RT-PCR során keletkező amplimereket jelölik. C: nem-otosclerosisos minta. OS: otosclerosisos minta. **B:** Tisztított és szétválasztott CD46 cDNS-ek (agaróz gél felvétel UV fény expozícióval). A számok a gélből tisztított és ismételt elválasztott CD46 izoformák amplimerjeit jelölik, amelyek a CD46 specifikus RT-PCR-ban keletkeztek. C: nem-otosclerosisos stapes talp. OS: otosclerosisos stapes talp. MW: molekulatömeg marker. 1: „c” variáns; 2: „e” variáns; 3: „d” variáns; 4: „f” variáns; 5: ismeretlen rövidebb variáns.

Az ábra forrása: Csomor P., Szalmás A., Kónya J., Sziklai I., Karosi T. Restriction analysis of otosclerosis-associated CD46 splicing variants. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 2010; **267**(2):219-226. (A szerzők hozzájárulásával)



10. ábra: A CD46 cDNS amplimerjeinek restrikciós analízisével kapott eredmények. Az öt szétválasztott CD46 variáns összehasonlító vizsgálatát molekulatömeg marker segítségével végeztük el. Ezek közül négyet sikerült megfeleltetnünk az irodalomban már korábban leírt variánsoknak: „c”, „e”, „d”, „f” variánsok, azonban az ötödik variánsnak a molekulatömege és a restrikciós mintázat alapján. Ennek az ismeretlen variánsnak a restrikciós mintázata teljesen megegyezik az „n” variánséval, azonban molekulatömege jelentősen eltér az „n” variánsétól. HinfI, AccI, StuI, HpyCH4V és BsaI restrikciós endonukleáz enzimek, amelyek felismerőhellyel rendelkeznek a CD46 molekula hypervariábilis régiójában. Az endonukleázok nevei után található zárójelekben lévő számok jelölik, hogy a hypervariábilis régióban mely exonban található az adott enzim felismerő-és hasítási helye. **A:** a „c” variáns hasítási mintázata. **B:** az „e” variáns hasítási mintázata. **C:** a „d” variáns hasítási mintázata. **D:** az „f” variáns hasítási mintázata. **E:** az ismeretlen rövidebb variáns hasítási mintázata. **K:** nem hasított kontroll amplimer. **MW:** molekulatömeg marker.

Az ábra forrása: Csomor P., Szalmás A., Kónya J., Sziklai I., Karosi T. Restriction analysis of otosclerosis-associated CD46 splicing variants. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 2010; **267**(2):219-226. (A szerzők hozzájárulásával)

TNF-ALFA RECEPTOR I/II EXPRESSZIÓS SAJÁTOSSÁGAINAK VIZSGÁLATA

Amint már korábban említettük, a szövettani- (H.E. festés), valamint a TNF-alfa receptor I/II- specifikus immunfluoreszcens vizsgálatokhoz az intakt stapes talpak mellett a részlegesen eltávolított stapes talpak közül csak olyanokat vizsgáltunk, amelyek a fragmentumaikból rekonstruálhatóak voltak az orientáció és a beágyazás során. A szövettani és az immunfluoreszcens vizsgálatok során minden alkalommal egymás után következő szövettani metszeteket használtunk fel.

Szövettani vizsgálatok

Negyven ankylotikus stapes talp esetében volt egyértelműen megállapítható az otosclerosis szövettani diagnózisa (n=40). Az otosclerosisos esetek közül 24 esetben tűntek aktívnak (grádus I – 11/A. ábra) (grádus II – 11/D. ábra) az otosclerosisos gócok a szövettani kép alapján, 16 esetben pedig inaktívnak (grádus III – 12/A. ábra) (grádus IV – 12/D. ábra) (4. táblázat). A részlegesen eltávolított stapes talpakat kizártuk a vizsgálatainkból, mert a stapes talp anterior és a posterior pólusában található csontléziók idézik elő a stapes rögzülését az ovális ablak körüli térrészben, amelyek feltehetőleg a műtétet követően a stapes fülkében maradtak. A negyven nem-otosclerosisos stapes fixációból 27 esetben tapasztaltunk annuláris calcificatiót, amelyet az eozinophilen festődő extracelluláris mátrix, csökkenő sejtes állomány, és hypovascularizatio jellemez (4. táblázat, 13/D. ábra). A fennmaradó 13 esetben globuláris fibrózist sikerült diagnosztizálni a szövettani vizsgálatok eredményeként, amelyeknél a csont reszorpció mono-vagy bipolárisan jelentkezett a stapes talpak anterior és posterior pólusain. (4. táblázat., 13/A. ábra)

TNFR1/II- specifikus immunfluoreszcens vizsgálatok (IFA)

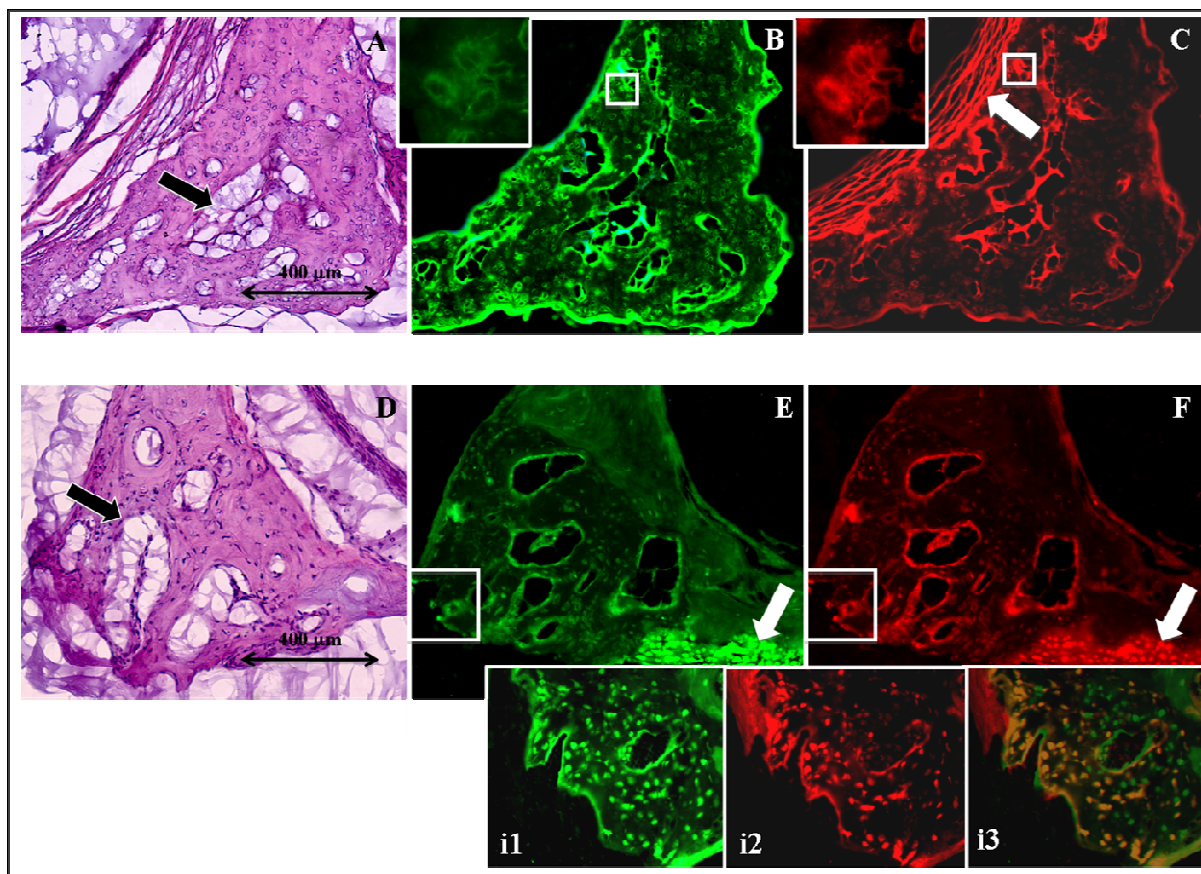
A stapes talp vestibuláris felszínén elhelyezkedő hyalin porcréteg chondrocytái minden esetben markáns immunreakciót mutattak a TNFR1/II komplexekkel szemben, amely nem meglepő, figyelembe véve azt a tényt, hogy ezek a sejtek olyan embryonális „maradványok”, amelyekből a primer otosclerosis során a stapes talpban megjelenő lézió formáló sejtek kialakulhatnak (17) (11/B,C,E,F. ábra; 12/B,C,E,F. ábra). Ezzel szemben a

nem-otosclerosis stapes fixációk esetében csont léziókban található macrophagok, osteocyták és osteoclastok felszínén nem tapasztalható szignifikáns TNFRI/II expresszió az immunfluoreszcens vizsgálatok alapján (13/B,C,E,F. ábra). Az otosclerosis góciókban található osteoclastok mindkét TNF- α receptor markáns expresszióját mutatták, amely jól jelzi a csontszövetben lejátszódó, aktív gyulladásal kísért kóros csontremodellációt a fent említett léziókban. Az otosclerosis minták esetében a két különböző típusú TNF- α receptor expressziójának mértéke, valamint expressziós mintázatuk erős összefüggést mutat a betegség szövettani aktivitásával. Ezt az összefüggést statisztikai analízissel is alátámasztottuk (Yates-korrigált χ^2 teszt, $p < 0,001$; 4. táblázat). A szövettanilag aktív otosclerosis (grádus I-II) minták esetében nagyszámú sokmagvú osteoclast tölti ki a nagy kiterjedésű pseudovascularis tereket, amely sejtek a TNFRI erős granuláris expressziója mellett a TNFRII markáns expressziójával is jellemezhetőek (11/B,C,E,F. ábra). A betegség szövettanilag aktív stádiumától eltérően az otosclerosis előrehaladott, inaktív szakaszában (grádus III-IV) az osteoclastok csökkenő száma jellemzi a szövettani képet, amelyek gyenge annuláris TNFRI-specifikus immunreakciót mutatnak, míg a TNFRII immunreakció gyakorlatilag hiányzik (12/B,C,E,F. ábra).

4. táblázat: Tumor Nekrózis Faktor-alfa Receptorokra (TNFRI és TNFRII) specifikus immunreakció.

Kórszövettani leletek (H.E.) (n=80)	TNFRI	TNFRII
<i>Otosclerosis stapes fixáció (n = 40)</i>		
<i>Aktív otosclerosis (n=24) (grádus I-II)</i>	++ (+)	+++
<i>Inaktív otosclerosis (n=16) (grádus I-II)</i>	+ (+)	-
<i>Nem-otosclerosis stapes fixáció (n = 40)</i>		
<i>Annuláris kalcifikáció (n=27)</i>	-	-
<i>Globuláris fibrózis (n=13)</i>	-	-
<i>Stapes talpak vestibuláris felszínének hyalinporc rétege (n = 80)</i>	++	++

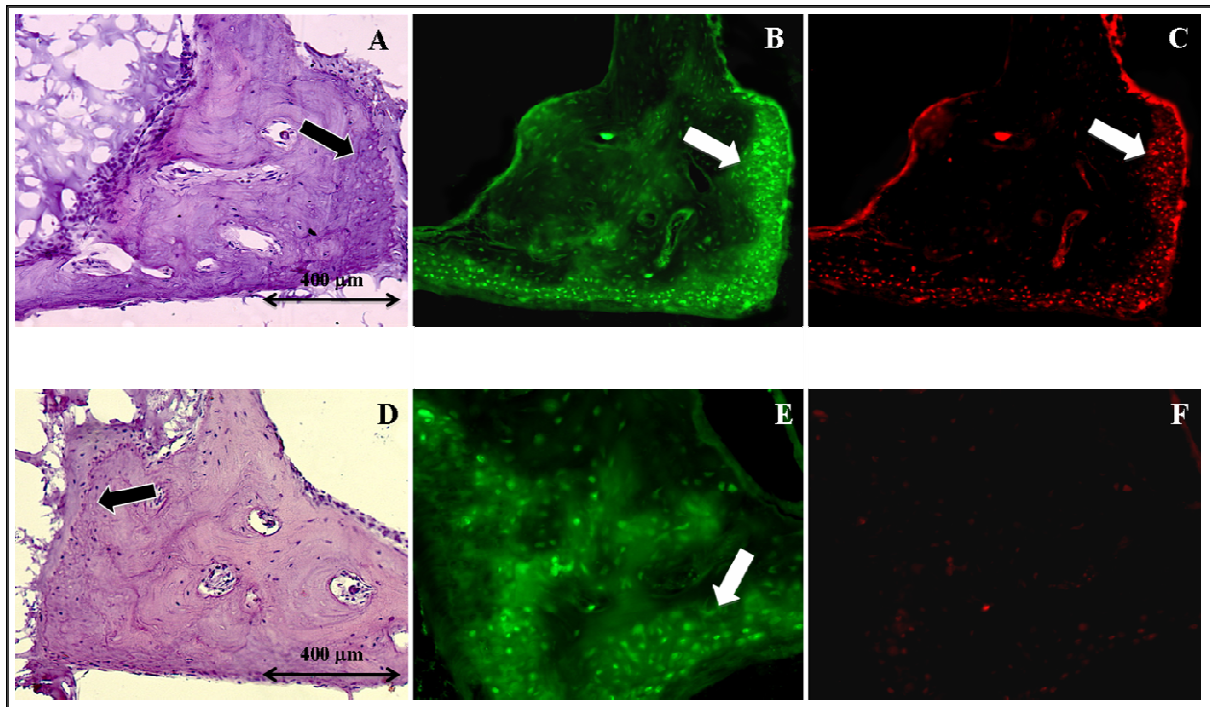
Jelölések: - negatív; + gyenge perivascularis immunreakció; ++ erős annuláris immunreakció; +++ durva granuláris, szinte összefolyó immunreakció; TNFRI: Tumor Necrosis Factor- α Receptor I-specifikus immunreakció, TNFRII: Tumor Necrosis Factor- α Receptor II-specifikus immunreakció.



11. ábra: A TNFRI/II immunofluoreszcens vizsgálatának eredményei szövettanilag aktív (grádus I-II) minták esetében. **A:** Aktív (grádus I) otosclerosis góc a stapes talp anterior pólusán (haematoxylin-eozin festés). A szövettani képen tágas pseudovascularis terek (fekete nyíl) figyelhetők meg, amelyeket pseudoseptumok tagolnak, jellemző a hypercellularitás. **B:** Az előző metszet TNFRI expressziójának kimutatása. Az osteoclastok intenzív, granuláris TNFRI specifikus immunreakciót mutatnak. A beillesztett kis kép nagyobb nagyítással mutatja a TNFRI-t kifejező osteoclastokat. **C:** Az otosclerosis gócot alkotó sejteknél erős TNFRII specifikus immunreakciót tapasztalunk. A fehér nyíllal jelölt középfül nyálkahártya szintén intenzív TNFRII immunreakciót mutat. A beillesztett kis képen láthatjuk a TNFRII-t intenzíven kifejező osteoclastokat. **D:** Mérsékelt szövettani aktivitású (grádus II) otosclerosis góc a stapes talp posterior pólusában (haematoxylin-eozin festés). Fekete nyíllal jelöltük a pseudovascularis tereket, az osteoid állományban még mindig sok sejt található, de a cement vonalak lefutása már szabálytalan, fonatos, örvénylő szerkezetű. **E:** Az előző metszet TNFRI expressziójának kimutatása. Az otosclerosis léziót kialakító sejtek markáns annularis immunreakciót mutatnak. A stapes talp vestibuláris felszínén található hyalinporc réteg (fehér nyíl) intenzív TNFRI expresszióval jellemezhető. **F:** A TNFRII kifejeződése nagyon hasonló a TNFRI esetében tapasztaltnak. A fehér nyíllal jelölt hyalinporc réteg a stapes talp vestibularis felszínén erős TNFRII specifikus immunreakciót mutat. **i1:** TNFRI-t kifejező osteoclastok nagyobb nagyítással. **i2:** TNFRII-t kifejező osteoclastok nagyobb nagyítással. **i3:** Az előző két kép alapján készített fúziós felvétel. Az aktív otosclerosis gócban található osteoclastok mindkét TNF- α receptort kifejezik, amit a narancssárga szín jelez számunkra, de a perivascularis területen csak a TNFRI expressziója észlelhető (zöld szín).

Az ábra forrása: Csomor P., Sziklai I., Karosi T. TNF-alpha receptor expression correlates with histological activity of otosclerosis. *Otol Neurotol*, 2009; 30(8):1131-1137.

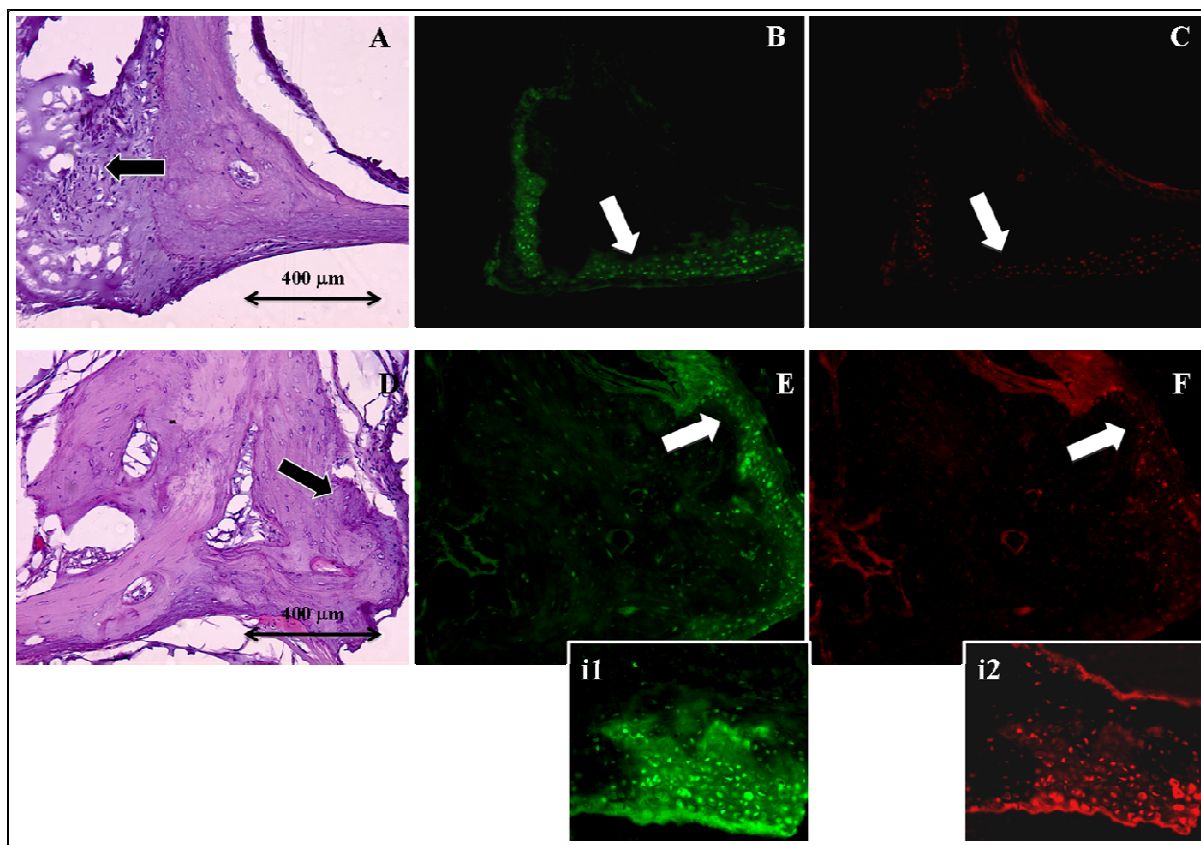
(A szerzők hozzájárulásával)



12. ábra: A TNFRI/II immunofluoreszcens vizsgálatának eredményei szövettanilag inaktív (grádus III-IV) minták esetében. **A:** A stapes talp anterior pólusán található inaktív (grádus III) otosclerosis góc (haematoxylin-eozin festés). A szövettanilag inaktív otosclerosis gócot a basophil festődés, hypovasclularizatio, hypocellularitás, és a cement vonalak fonatos szerkezete jellemzi. A fekete nyíllal jelölt hyalinporc réteg deformált. **B:** Az előző metszeten gyenge, annuláris TNFRI specifikus immunreakció látható. A fehér nyíllal jelölt hyalinporc réteg továbbra is a TNFRI markáns kifejeződését mutatja. **C:** A lézióformáló sejtek TNFRII specifikus immunreakciója elhanyagolható mértékű, ellentétben a hyalinporc réteggel, amelyet fehér nyíllal jelöltünk. **D:** Előrehaladott (grádus IV) otosclerosis (haematoxylin-eozin festés). Az osteoid állomány avascularis, sejtmintes és jelzett eosinophiliát mutat. A hyalinporc réteget fekete nyíllal jelöltük. **E:** Az előző metszetben a TNFRI gyenge annuláris kifejeződése tapasztalható. A stapes talp vestibularis felszínén található hyalinporc réteg (fehér nyíl) továbbra is intenzív TNFRI immunreakciót mutat. **F:** A TNFRII specifikus immunreakció gyakorlatilag negatív.

Az ábra forrása: Csomor P., Sziklai I., Karosi T. TNF-alpha receptor expression correlates with histological activity of otosclerosis. *Otol Neurotol*, 2009; 30(8):1131-1137.

(A szerzők hozzájárulásával)



13. ábra: A TNFRI/II immunofluoreszcens vizsgálatának eredményei nem-otosclerosisos stapes fixációk esetében. **A:** Globuláris fibrózis a stapes talp anterior pólusán (haematoxylin-eozin festés). A stapes talp megjelenése normális, fekete nyíllal jelöltük a fibroticus nodulust. **B:** Az osteoid állományban lévő sejtek nem mutatnak értékelhető TNFRI expressziót, azonban a fehér nyíllal jelölt hyalinporc réteg markáns annuláris immunreakciót mutat. **C:** A hyalinporcban található chondrocytákon (fehér nyíl) kívül más sejtípus nem expresszálja a TNFRII-t. **D:** Annuláris calcificatio (haematoxylin-eozin festés). A deformált stapes talp sejtmentes, a cementvonalak pedig lamelláris mintázatúak, a hyalinporc réteg töredezett (fekete nyíl). **E:** Az előző metszet esetében nem tapasztaltunk értékelhető TNFRI specifikus immunreakciót. A hyalinporc réteg itt is erős annuláris immunreakciót mutat (i1: nagyobb nagyítással). **F:** A hyalinporc réteg chondrocytáival (i2) ellentétben az osteocyták és az osteoblastok nem fejezik ki a TNFRII-t.

Az ábra forrása: Csomor P., Sziklai I., Karosi T. TNF-alpha receptor expression correlates with histological activity of otosclerosis. *Otol Neurotol*, 2009; 30(8):1131-1137.

(A szerzők hozzájárulásával)

APOPTÓZIS MARKEREK VIZSGÁLATA

A szövettani (H.E. festés), valamint a hCIAP1/2 és a Granzyme- β specifikus immunofluoreszcens vizsgálatokhoz az intakt stapes talpak mellett a részlegesen eltávolított stapes talpak közül csak azokat használtuk fel, amelyek a fragmentumaikból rekonstruálhatóak voltak az orientáció és a beágyazás során. A szövettani és az immunofluoreszcens vizsgálatokhoz minden esetben egymás után következő szövettani metszeteket használtunk fel.

Szövettani vizsgálatok

A szövettani vizsgálatok eredményeként 27 ankyloticus stapes minta esetében sikerült megállapítanunk az otosclerosis diagnózisát az észlelt szövettani jellegzetességek alapján. Ezek között a minták között 19 esetben szövettanilag aktív (14/A. ábra, 15/A. ábra) otosclerosis volt megfigyelhető, még a fennmaradó 8 minta esetében szövettanilag inaktív (16/A. ábra) stádiumú otosclerosis volt észlelhető (5. táblázat). A szövettanilag aktív otosclerosis nagy pseudovascularis terekkel jellemezhető, amelyeket nagyszámú, terjedelmes, alakatlan, többmagvú osteoclastok töltenek ki. A betegség előrehaladott, szövettanilag inaktív szakaszai a vascularis terek obliterációjával, a lacunák reszorpciójával, valamint az osteoclastok csökkent számával voltak jellemezhetőek (16/A. ábra). A stapes talpak hyalinporc rétegében az otosclerosisos gócok éles határvonalakkal jellemezhető léziókat hoztak létre, amelyek jelentős szöveti destrukciót eredményeznek, a perifériásan elhelyezkedő részeken az eltűnő chondrocytákat üres, úgynevezett „halo” sejtekként észlelhetjük.

A 13 nem-otosclerosisos stapes fixáció közül 11 annuláris calcificationnak, 2 pedig haemosiderosishoz bizonyult a szövettani vizsgálat során. Az annuláris calcificatiót (17/A. ábra) eozinophilen festődő extracelluláris mátrix, csökkent cellularitás és hypervascularisatio jellemzi. A haemosiderosist a stapes talp intenzív csontremodellációja jellemzi (5. táblázat).

5. táblázat: Az apoptózis markerek vizgyálatához használt immunofluoreszcens reakciók intenzitása és mintázata.

Kórszövettani leletek (n=44)	hCIAP-1	hCIAP-2	Granzyme-β
Otosclerosis (n=27)			
Aktív (n=19)	+	+	-/+
Inaktív (n=8)	-	-/+	+
Hyalinporc réteg	+	+	-/+
Nem-otosclerosisos stapes fixáció (n=13)			
Annuláris calcificatio (n=11)	+	+	-
Haemosiderosis (n=2)	+	+	-
Hyalinporc réteg	+	+	-
Normál stapes talpak (n=4)			
Hyalinporc réteg	+	+	-

Jelölések: - negatív immunreakció; + gyenge annuláris immunreakció; ++ gyenge homogén immunreakció; +++ erős homogén, vagy gyenge granuláris immunreakció; ++++ erős összefolyó, és erős granuláris immunreakció; hCIAP-1 - hivatalos génbank (PubMed) név: baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis) repeat containing-2 specifikus immunreakció; hCIAP-2 – hivatalos génbank (PubMed) név: baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis) repeat containing-3; Granzyme-β - hivatalos génbank (PubMed) név: cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1 specifikus immunreakció.

Apoptózis markerek immunofluoreszcens vizsgálata

A hyalinporc réteg vestibuláris felszínén található chondrocyták jelentős pozitivitást mutattak a hCIAP1/2 specifikus immunreakció során (5. táblázat, 17/F,G. ábra), azonban a Granzyme-β-val szembeni immunreakció negatív volt (17/H. ábra). Ez nem meglepő, hiszen ezen sejteket embryonális „maradvány” sejtekként definiálták, amelyek az alany egész életén keresztül perzisztálhatnak az apoptózis bármely észlelhető jele nélkül. Ezek az immortalizált sejtek magyarázhatják a lézió-formáló sejtek eredetét az stapes talpban az otosclerosis során.

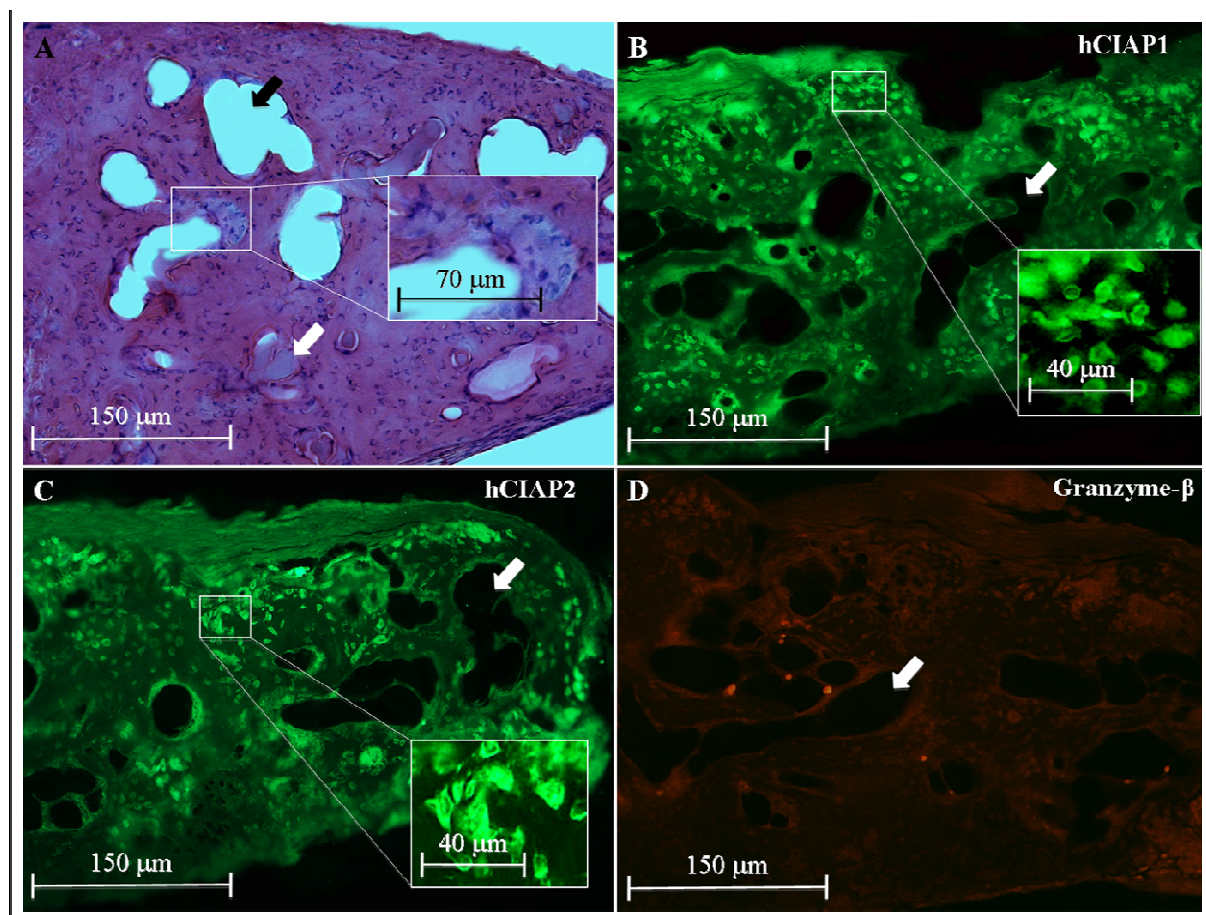
Az apoptózis inhibitor (hCIAP1/2) és induktor (Granzyme-β) fehérjék expressziós szintjeinek szemikvantitatív meghatározása, valamint az expressziós mintázatuk (lokalizáció) szoros, szignifikáns összefüggést mutatott a betegség szövettani aktivitásával (Yates-korrigált χ^2 teszt, $p < 0,001$; 5. táblázat).

Az aktív otosclerosisos minták esetében a széles pseudovascularis tereket kitöltő többmagvú, nagyméretű osteoclastok emelkedett számát tapasztaltuk, ezeknél a sejteknél intenzív hCIAP1 és hCIAP2 antigén expressziót figyelhetünk meg. A hCIAP1 erős immunreakciót mutatott, amely granuláris, perinucleáris mintázattal volt jellemezhető, míg

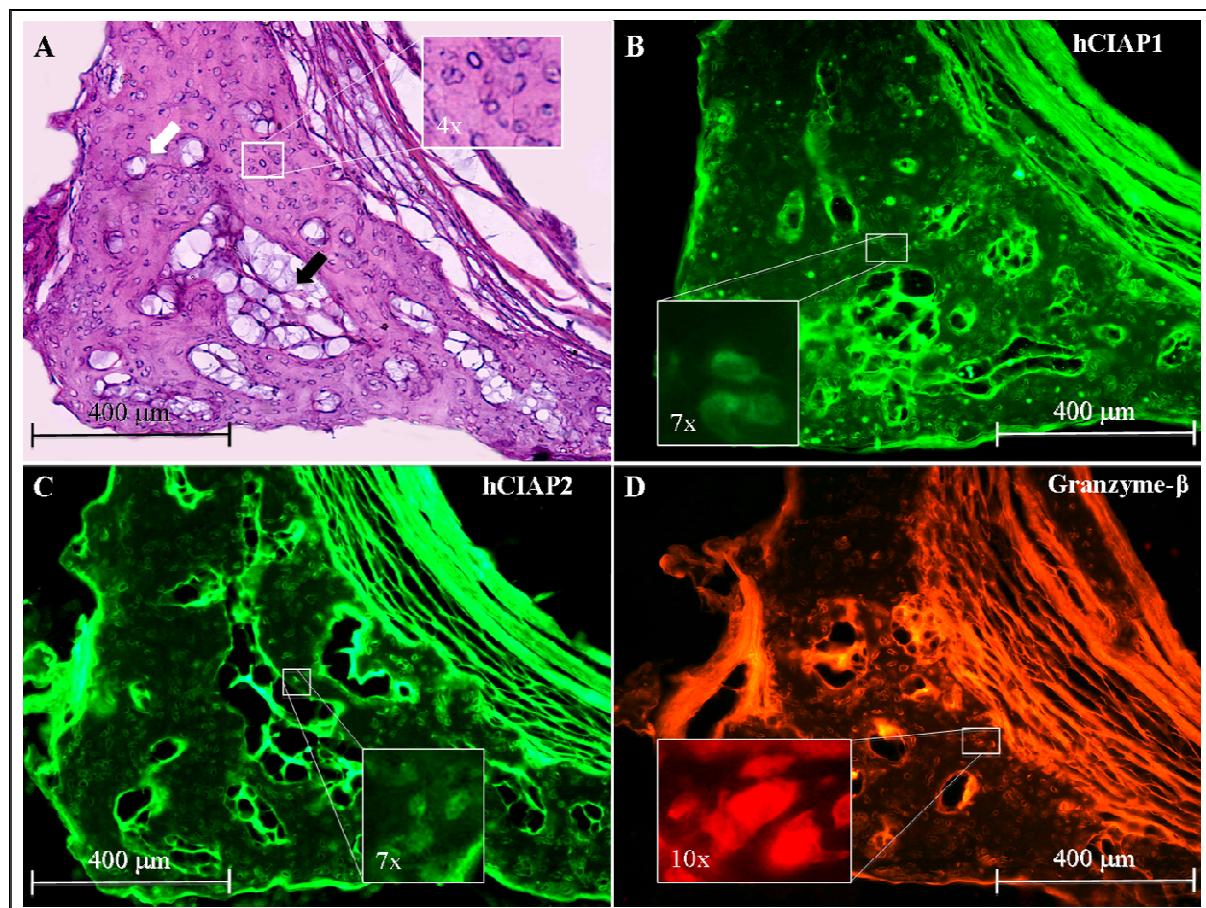
hCIAP2 homogén citoplazmatikus immunreakciót mutatott (14/B,C. ábra). Az aktív otosclerosis mintáknál minden esetben negatívnak találtuk a Granzyme- β specifikus immunreakciót, ami jelzi a blokkolt apoptózist, és a sejtek fokozott túlélését (14/D. ábra). Az aktív otosclerosis ellenében az előrehaladott stádiumú otosclerosis minták esetében csökkent számú osteoclastot találunk, amelyeknél gyenge lineáris, vagy negatív hCIAP1 és hCIAP2 specifikus immunreakciók voltak megfigyelhetők (15/B,C. ábra). A csökkent szövettani

Az inaktív otosclerosis minták esetében a H.E.-festett szövettani metszetek képét az üres „halo” sejtek uralják, amelyek az immunofluoreszcens vizsgálatoknál nagyfokú, markáns Granzyme- β specifikus immunreakciót mutattak, igazolva ezzel az aktív apoptotikus folyamatok jelenlétét (16/D. ábra).

Szemben az otosclerosis mintáknál tapasztalt sajátosságokkal, a nem-otosclerosis stapes fixációk és az egészséges stapes talpak esetében nem volt kimutatható szignifikáns Granzyme- β expresszió a csont léziókban található osteoclastok vagy macrophagok felszínén (17/D,H. ábra). Ugyanezen minták esetében az apoptózis inhibitor proteinek (hCIAP1/2) mérsékelt (fiziológiás) expressziója volt megfigyelhető, jelezve az apoptotikus folyamatok feltartóztatását (17/B,C,F,G. ábra).



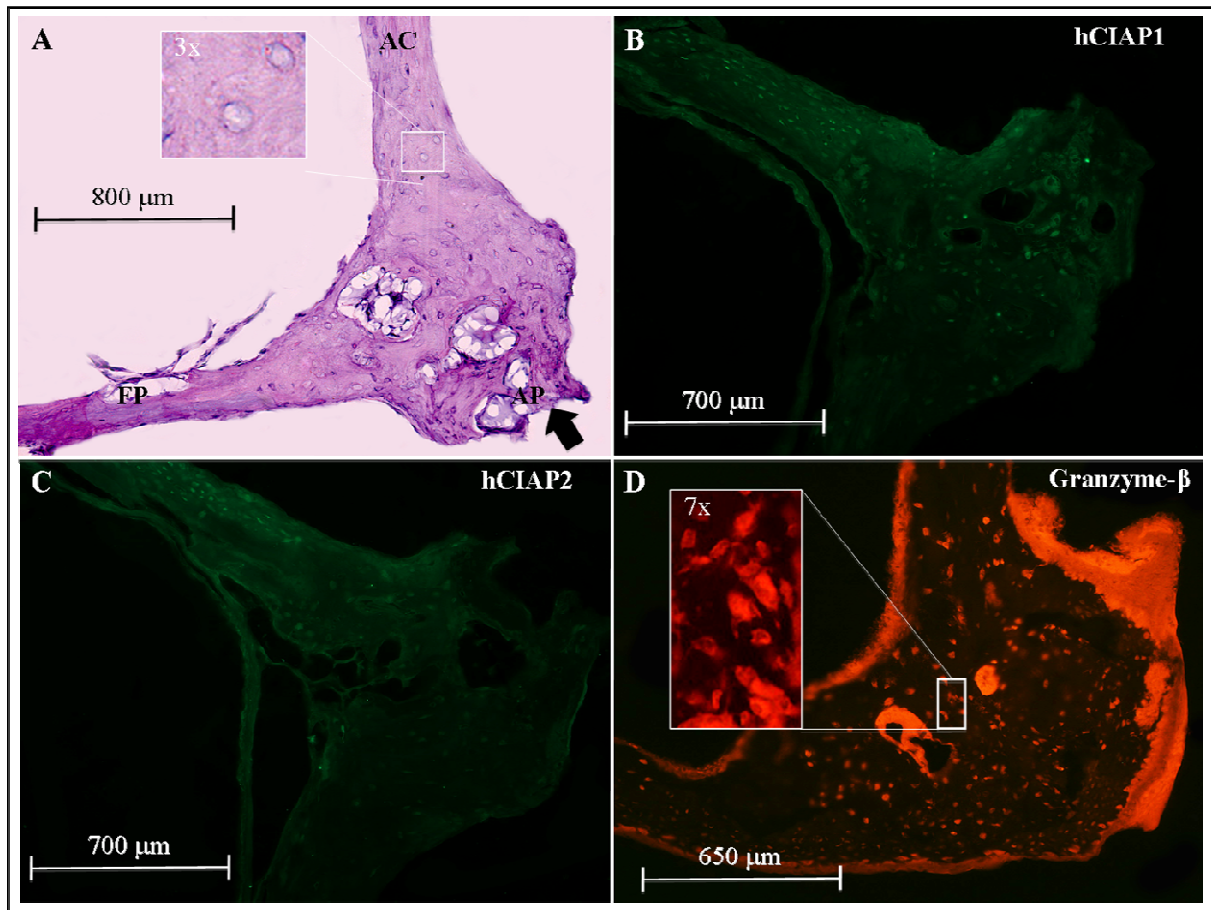
14. ábra: hCIAP-1/hCIAP-2 és a Granzyme- β specifikus immunofluoreszcens vizsgálatok eredményei szövettanilag aktív otosclerosis minták esetében. **A:** aktív otosclerosis góc a stapes talp posterior pólusán (haematoxylin-eozin festés). Hypercellularitás és széles pseudovascularis terek (fekete nyíl) láthatóak a metszeten. Az osteoclastok által kiváltott osteolysis látható, az osteolyticus lacunákat hyalin-szerű anyag (fehér nyíl) tölti ki. A beillesztett kisebb képen az osteolysist végző aktív sokmagvú osteoclastok láthatóak nagyobb nagyítással. **B:** Az előző metszet hCIAP1 expressziójának vizsgálata. A metszeten látható osteoclastok és az osteoblastok erős homogén hCIAP1 specifikus immunreakcióval jellemezhetőek. A beillesztett kisebb képen a hCIAP-1-et kifejező osteoclastok láthatóak nagyobb nagyítással. **C:** A hCIAP-2 specifikus immunreakció intenzív homogén festődést mutat a citoplazmában. A beillesztett kisebb képen a hCIAP-2-öt kifejező osteoblastok láthatóak nagyobb nagyítással. **D:** A Granzyme- β specifikus immunreakció gyakorlatilag negatív. A fehér nyilak (B,C,D) jelölik a széles pseudovascularis tereket az otosclerosis gócban. Az ábra forrása: Csomor P., Sziklai I., Liktör B., Z. Szabó L., Pytel J., Jóri J., Karosi T. Otosclerosis: disturbed balance between cell survival and apoptosis. *Otol Neurotol*, 2010; 31(6):867-874. (A szerzők hozzájárulásával)



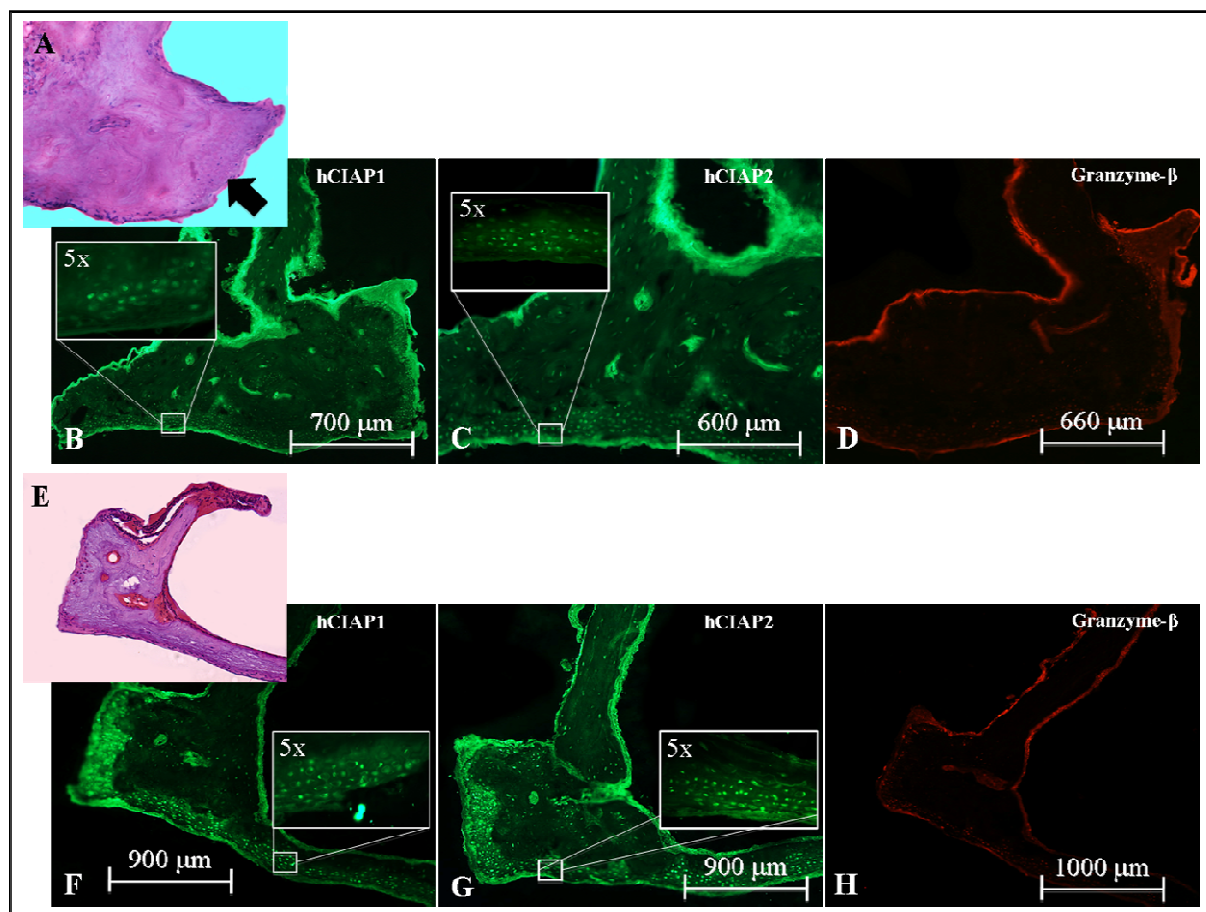
15. ábra: hCIAP-1/hCIAP-2 és a Granzyme- β specifikus immunofluoreszcens vizsgálatok eredményei csökkent szövettani aktivitású otosclerosis minták esetében. **A:** Csökkent szövettani aktivitású otosclerosis góc a stapes talp anterior pólusán (haematoxylin-eozin festés). A pseudovascularis tereket pseudoseptumok választják el, amelyet fekete nyíllal jelöltünk. Az osteoid állomány még mindig hypercelluláris, a cement vonalak lefutása szabálytalan, fonatos és koncentrikus mintázatot követ. Az otosclerosis gócban található osteoclastok üres hypochromaticus magokkal jellemezhető úgynevezett „halo” sejtekként jelennek meg a szövettani képen. **B:** Az előző metszet hCAIP-1 expressziójának vizsgálata. Az otosclerosis léziót formáló osteoclastok közepesen erős annuláris immunreakcióval jellemezhetőek. A beillesztett kisebb kép a hCIAP-1-et kifejező osteoclastokat mutatja nagyobb nagyítással. **C:** A hCIAP-2 kifejeződése gyenge, annuláris citoplazmatikus immunreakciót mutat. A beillesztett kisebb kép a hCIAP-2-öt kifejező osteoclastokat mutatja nagyobb nagyítással. **D:** A Granzyme- β kifejeződése intenzív homogén citoplazmatikus immunreakciót mutat. A beillesztett kisebb kép a Granzyme- β -t kifejező osteoclastokat mutatja nagyobb nagyítással.

Az ábra forrása: Csomor P., Sziklai I., Liktör B., Z. Szabó L., Pytel J., Jóri J., Karosi T. Otosclerosis: disturbed balance between cell survival and apoptosis. *Otol Neurotol*, 2010; 31(6):867-874.

(A szerzők hozzájárulásával)



16. ábra: hCIAP-1/hCIAP-2 és a Granzyme- β specifikus immunofluoreszcens vizsgálatok eredményei szövettanilag inaktív, úgynevezett „kiégett” otosclerosis minták esetében. **A:** Inaktív otosclerosisos góc a stapes talp anterior pólusán. Hypocellularitás, hypovascularizatio és jelzett basophilia, valamint a cement vonalak fonatos szerkezete figyelhető meg a szövettani képen (haematoxylin-eozin festés). A hyalin réteg deformált (fekete nyíl), **AC** jelöli az elülső szárat, **AP** az anterior pólust, **FP** a stapes talpat. A beillesztett kisebb képen az üres, úgynevezett „halo” sejtekként megjelenő osteoclastok láthatóak nagyobb nagyítással. **B:** Az előző metszetet gyenge, annuláris hCAIP-1 expresszió jellemzi. **C:** A lézió-formáló sejtek hCIAP2 expressziója elhanyagolható mértékű. **D:** A granzyme- β specifikus immunreakció erőteljes homogén citoplazmatikus festődést mutat. A beillesztett kisebb képen nagyobb nagyítással láthatóak a Granzyme- β -t kifejező sejtek. Az ábra forrása: Csomor P., Sziklai I., Liktör B., Z. Szabó L., Pytel J., Jóri J., Karosi T. Otosclerosis: disturbed balance between cell survival and apoptosis. *Otol Neurotol*, 2010; 31(6):867-874. (A szerzők hozzájárulásával)



17. ábra: hCIAP-1/hCIAP-2 és a Granzyme- β specifikus immunofluoreszcens vizsgálatok eredményei nem-otosclerosisos és normál minták esetében. **A:** Annuláris calcificatio (haematoxylin-eozin festés). A stapes talp deformált, a cement vonalak lamelláris mintázatot mutatnak. A hyalin réteg töredezett (fekete nyíl). **B:** Az előző metszetet gyenge annuláris hCIAP-1 expresszió jellemzi. **C:** hCIAP2 szintén gyenge annuláris expressziót mutat. **D:** A Granzyme- β specifikus immunreakció negatív. **E:** Normál stapes talp szövettani képe (haematoxylin-eozin festés). **F:** Az előző metszetet gyenge annuláris hCIAP-1 expresszió jellemzi. **G:** hCIAP-2 szintén gyenge annuláris expressziót mutat. **H:** Az osteoid állományban nincs kimutatható Granzyme- β specifikus immunreakció.

A beillesztett kis képek a hCIAP1 és hCIAP-2 specifikus immunreakciót mutatják a hyalinporc rétegben. A chondrocyták erős annuláris immunreakciót mutatnak az apoptózis inhibitor fehérjékkel szemben, amely független volt a betegség szövettani aktivitásától.

Az ábra forrása: Csomor P., Sziklai I., Liktör B., Z. Szabó L., Pytel J., Jóri J., Karosi T. Otosclerosis: disturbed balance between cell survival and apoptosis. *Otol Neurotol*, 2010; 31(6):867-874.

(A szerzők hozzájárulásával)

A KÍSÉRLETES MUNKÁBAN RÉSZT VEVŐ TÁRSSZERZŐK MUNKÁJÁNAK ISMERTETÉSE

Ebben a részben tételesen foglalkozunk össze azt, hogy az értekezés alapjául szolgáló közlemények elkészítése során a munka mely fázisában működtek közre az adott közlemény társszerzői. A felsorolást a tézisek alapjául szolgáló publikációnként bontva mutatjuk be.

Csomor P., Szalmás A., Kónya J., Sziklai I., Karosi T. Restriction analysis of otosclerosis-associated CD46 splicing variants. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 2010; 267(2):219-226.

1. *Szövettani diagnózis és a kanyaróvírus RNS kimutatása:*

- a. Mintagyűjtés megszervezése, klinikai vizsgálatok: dr. Karosi Tamás.
- b. Szövettani vizsgálatok: Csomor Péter.
- c. Szövettani vizsgálatok kiértékelése: Csomor Péter, dr. Karosi Tamás.
- d. Nukleinsav extrakció, és a kanyaróvírus genom kimutatása: Csomor Péter, Szalmás Anita.

2. *CD46 variánsok kimutatása RT-PCR technikával:*

- a. CD46 specifikus RT-PCR tervezése, optimalizálása: dr. Karosi Tamás, Szalmás Anita.
- b. CD46 specifikus RT-PCR kivitelezése: Csomor Péter.
- c. CD46 amplimerek tisztítása akrilamid gélből: Szalmás Anita, Csomor Péter.

3. *Az elkülönített CD46 variánsok restrikciós analízise:*

- Restrikciós analízis: Csomor Péter, Szalmás Anita.

4. *Kanyaróvírus specifikus ELISA:*

- ELISA: dr. Karosi Tamás, Csomor Péter.

5. *A kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése, statisztikai analízis:* Csomor Péter, dr. Kónya József, Szalmás Anita, dr. Karosi Tamás, Prof. Dr. Sziklai István.

6. *Kézirat revízió:* dr. Karosi Tamás.

Csomor P., Sziklai I., Karosi T. TNF-alpha receptor expression correlates with histological activity of otosclerosis. *Otol Neurotol*, 2009; 30(8):1131-1137.

1. *Szövettani vizsgálatok:*

- a. Mintagyűjtés megszervezése, klinikai vizsgálatok: dr. Karosi Tamás.
- b. Szövettani vizsgálatok: Csomor Péter.
- c. Szövettani vizsgálatok kiértékelése: Csomor Péter, dr. Karosi Tamás.

2. *TNFR1/II specifikus immunfluoreszcens vizsgálatok:*

- a. Úszó metszetek elkészítése, immunfluoreszcens vizsgálatok kivitelezése, mikroszkópos munka, archiválás: Csomor Péter.
- b. Immunfluoreszcens vizsgálatok eredményeinek kiértékelése: Csomor Péter, dr. Karosi Tamás.

3. *A kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése, statisztikai analízis:* Csomor Péter, dr. Karosi Tamás, Prof. Dr. Sziklai István.

4. *Kézirat revízió:* dr. Karosi Tamás.

Csomor P., Sziklai I., Liktör B., Z. Szabó L., Pytel J., Jóri J., Karosi T. Otosclerosis: disturbed balance between cell survival and apoptosis. *Otol Neurotol*, 2010; 31(6):867-874.

1. *Szövettani vizsgálatok:*

- a. Mintagyűjtés megszervezése, klinikai vizsgálatok: dr. Karosi Tamás, dr. Liktör Bálint, Prof. Dr. Z. Szabó László, Prof. Dr. Pytel József, Prof. Dr. Jóri József.
- b. Szövettani vizsgálatok: Csomor Péter.
- c. Szövettani vizsgálatok kiértékelése: Csomor Péter, dr. Karosi Tamás.

2. *Apoptózis markerek immunofluoreszcens vizsgálata:*
 - a. Úszó metszetek elkészítése, immunofluoreszcens vizsgálatok kivitelezése, mikroszkópos munka, archiválás: Csomor Péter.
 - b. Immunofluoreszcens vizsgálatok eredményeinek kiértékelése: Csomor Péter, dr. Karosi Tamás.
3. *A kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése, statisztikai analízis:* Csomor Péter, dr. Karosi Tamás, Prof. Dr. Sziklai István.
4. *Kézirat revízió:* dr. Karosi Tamás.

MEGBESZÉLÉS

A kezdeti céljainkkal összhangban több különböző aspektusból (CD46 polimorfizmus, TNF- α mediátorrendszer és az apoptotikus folyamatok szabályozásának vizsgálata) is alkalmunk nyílt tanulmányozni az otosclerosis és nem-otosclerosis stapes fixációkat. A vizsgált folyamatok is jelzik a betegség komplex etiopathogenetikai hátterét. A nem-otosclerosis stapes fixációk, amelyek az otosclerosisétól teljesen eltérő etiológiai háttérrel jellemezhetők, jó kontrollnak bizonyultak a vizsgálataink során. A jelenlegi és a korábbi eredményeink nagyon jól rávilágítanak az otosclerosis és az egyéb stapes fixációk közötti különbségekre (72,73). Ezek a különbségek azonban hagyományos haematoxylin-eozin festéssel történő szövettani analízis során manifesztálódnak a leglátványosabban. Ez a festési eljárás még mindig nélkülözhetetlen a korrekt differenciál diagnózis felállításában.

Ahogy azt már az irodalmi áttekintés c. fejezetben korábban részletesen ismertettük, a perzisztáló kanyaróvírus fertőzés szerepét az otosclerosis pathogenezisében számos kísérletben igazolták (8,9,10,13,18). Figyelmünket elsősorban a kanyaróvírus humán receptorára, a CD46 fehérjére és annak polimorfizmusára összpontosítottuk, az alternatív splicing variánsok vizsgálatát elvégezve. Kísérleteink során kimutattuk a kanyaróvírus genom jelenlétét az otosclerosis minták mindegyikében RT-PCR technika segítségével. Azonban a kontroll csoportban (nem-otosclerosis stapes fixációk) nem sikerült kimutatnunk a vírus genom jelenlétét. Az otosclerosis klinikai diagnózisa mellett minden esetben szövettani vizsgálattal (haematoxylin-eozin festés) is alátámasztottuk a betegség diagnózisát. Ennek jelentőségét és szükségességét az irodalmi áttekintés c. fejezetben már részletesen taglaltuk. Fontos hangsúlyoznunk azt a felismerést, hogy a kanyaróvírus genom jelenléte a betegség szövettani aktivitásától (grádus I-IV) teljes mértékben függetlenül minden esetben kimutatható volt. Egyes tanulmányok szerint a capsula otica perzisztáló kanyaróvírus fertőzése és ekkor az emberi capsula oticában lejátszódó vírusreplikáció lehet az egyik fő etiológiai tényezője az otosclerosis pathogenezisének (38,47). A vírus antigének folyamatos jelenléte a capsula oticában hosszan tartó stimulációt jelenthet a celluláris immunválasz számára. Ezzel egy állandósult gyulladásos reakciót idézhet elő, ami végül a sejtek károsodásához vezethet az érintett csontszövetben, noha a defektív funkciókkal jellemezhető kanyaróvírus nem képes közvetlen szövetkárosodás kiváltására (38,40,41,47). A CD3 és CD46 fehérjék antigének általi aktivációja következtében kiváltott immunológiai stimulusok

fontos szerepet játszanak a regulátor T-helper 1-es típusú sejtek differenciálódásában és aktivációjában (104,105). Ennek a regulátor T-sejt populációnak eszenciális szerepe van az a CD8⁺ autoreaktív T-sejtek eliminálásában (106). Ezeknek a regulátor sejteknek az elégtelen differenciációja, vagy inaktivációja csökkentheti, illetve meg is szüntetheti a saját szövetekkel szembeni toleranciát, amely különböző autoimmun betegségek megjelenését okozhatja (106).

A restrikciós analízis során leírt rövidebb, ismeretlen splicing variáns feltételezhetően az egyik a nemrégiben leírt otosclerosis-hoz kapcsolható új CD46 izoformák közül (50). Ezen otosclerosis-specifikus CD46 variánsok megjelennek az emberi capsula otica sejtjeinek felszínén. Valószínűleg az elégtelen antigén stimuláció következtében a CD3 és CD46 molekulák által közvetített kostimulációs szignál erősen gyengül, amely a regulátor T-helper 1 sejtek differenciálódásához szükséges (105,106). Ezek az események feltételezhetően egy a capsula oticával szembeni másodlagos autoimmun reakcióhoz vezethetnek, aminek következtében szenzorineurális halláscsökkenés léphet fel az érintett pácienseknél (56,75,107).

A CD46 variánsok restrikciós analízise érdekes információkkal szolgált a CD46 izoformák ko-expressziós mintázatát illetően mind az otosclerosisos, mind a nem-otosclerosisos stapes talpak esetében. Az otosclerosisos és a nem-otosclerosisos stapes fixációk esetében is ugyanazon öt CD46 variáns jelenlétét sikerült igazolni, azonban az expressziós mintázatok a szövettani leletekkel összefüggésben eltéréseket mutattak az egyes izoformák relatív expressziós szintjeit illetően. Az összes stapes talp mintában a „c”; „d”; „e”; „f”; és egy eddig ismeretlen rövidebb variáns jelenlétét sikerült igazolni. Az otosclerosisos esetekben az „f” variáns és az ismeretlen rövid variáns fokozott expresszióját tapasztaltuk a nem-otosclerosisos esetekhez képest. Az „f” variáns mRNS-éből hiányzik a 13-as exon, amely az alternatív splicing során vágódik ki, és a molekula citoplazmatikus doménjének nagyobb részét kódolja (108). Ez a domén felelős a CD46 molekula intracelluláris szignalizációban betöltött szerepéért, ugyanis itt találhatóak azok a foszforilációs helyek, amelyek a receptor aktivációját követő foszforiláz-mediált jelátvitelt megvalósítják (108). A 13-as exon hiánya megváltozott, vagy kóros intracelluláris szignalizációs folyamatokat eredményezhet. Ezek a változások a jelátviteli folyamatokban meghatározhatják a perzisztáló kanyaróvírus fertőzéssel szembeni fogékonyságot. Kísérleteink eredményei arra engednek következtetni, hogy a capsula otica egyedi Paramyxovírus receptor expressziós mintázata és a betegség szervspecifikus megjelenése között lényeges összefüggések állhatnak fent, ahogy azt már korábbi eredményeink is felvetették (50).

A TNF- α Receptorok vizsgálata során végzett megfigyeléseink számos új információval szolgálhatnak számunkra a betegség eltérő szövettani stádiumai közötti átmenet molekuláris biológiai hátterét, valamint a betegség gyulladásos etiopathogenetikai sajátosságait illetően. A betegség korai stádiumában a TNFR1 és a TNFR2 fokozott expressziója figyelhető meg, ezek a receptorok indukálják egy gyulladásos-osteolyticus kaszkád működését (18. ábra). A folyamat beindításában néhány gyulladásos cytokinnek (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, transforming growth factor- β) és a csontanyagcserére specifikus fehérjéknek (osteoprotegerin - OPG, bone morphogenetic protein - BMP, dystrophic dysplasia sulfate transporter - DDST) is másodlagos szerepe lehet (72,73). A felfokozott csontanyagcsere végeredményeként az osteoid állomány meszesedése figyelhető meg (kiégett „burnout” otosclerosis), amely az osteoid állomány sejtes elemeinek apoptózisával jár együtt (1,87,109,110).

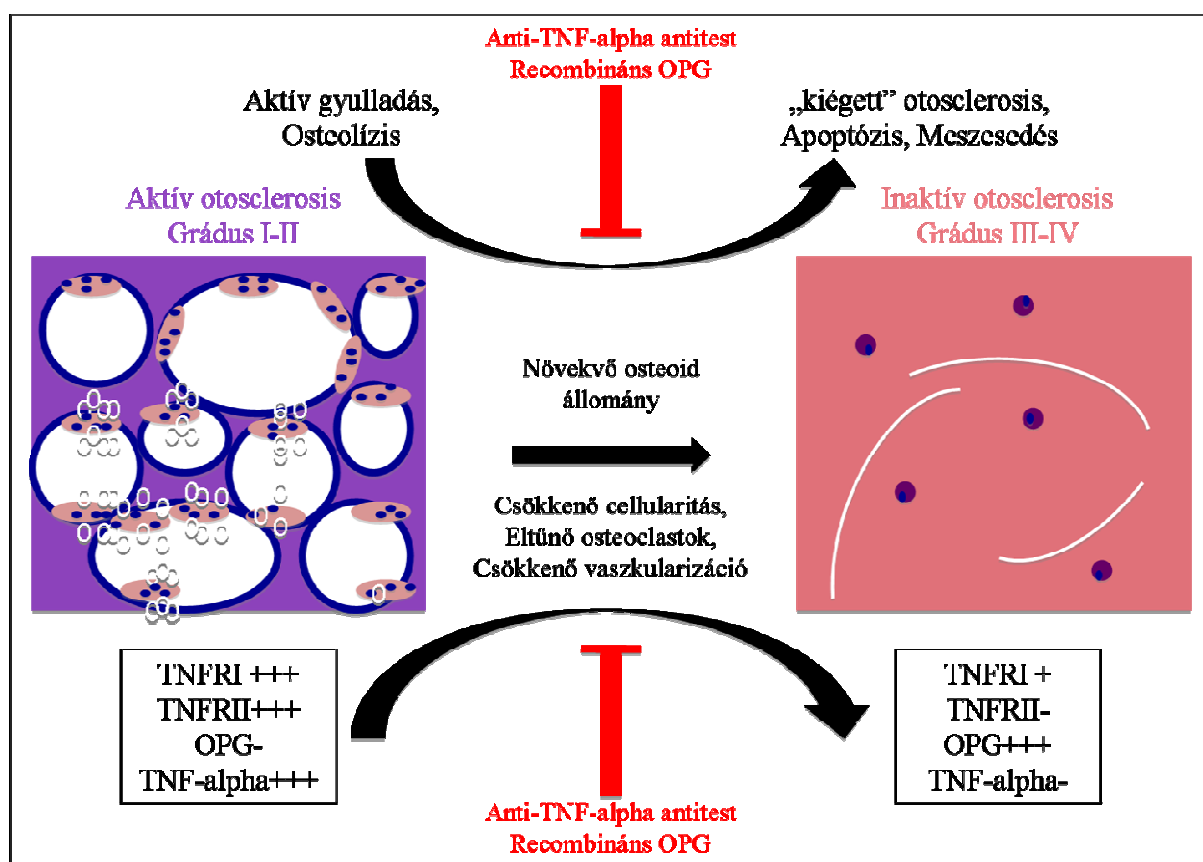
Az otosclerosis során végbemenő kóros csontremodelláció szervspecifitást mutat a capsula otica iránt. Az otosclerosis léziók megjelenése kizárólagosan a belső fül csontotokjára korlátozódik, azon kívül sehol sem figyelhető meg az emberi szervezetben (87,111). A jelenség hátterében feltehetően az capsula otica speciális fejlődéstani sajátosságai és egyedi kanyaróvírus receptor expressziós mintázata állhatnak (50,87,111).

Az otosclerosis góciókban megfigyelhető osteoclastoknál egy differenciálatlan, embrionális jellegű (CD51/61 antigén expressziója) fenotípus a meghatározó szemben a nem-otosclerosis stapes fixációk esetében vizsgált osteoclastokkal (17). Az osteoclastokra általában nem jellemző a CD51/61 antigének jelenléte. Ezért feltehetően az otosclerosis góciókban lévő osteoclastok a capsula otica középső rétegében elhelyezkedő nyugvó, embrionális sejtekből differenciálódhatnak (17). Ez a sejt transzformációs folyamat magyarázattal szolgálhat arra vonatkozóan, hogy az otosclerosis góciókban a középső réteg (globuli interossei) miért nem jelenik meg (1,17,87,111). A globuli interosseit képező chondrocyta-szerű sejtek viszonylag alacsony metabolikus aktivitással jellemezhetőek, s az egész életen át perzisztálhatnak anélkül, hogy lényegesebb morfológiai változásokon mennének keresztül (87). Korábbi feltételezéseinkkel összhangban a fentebb említett sejteket pluripotens embrionális maradványsejteknek tekinthetjük, amelyek reaktiválódva osteoclastokká differenciálódhatnak a kanyaróvírus fertőzésre adott gyulladásos immunválasz következtében (17). Jelenlegi kísérleteink során kapott eredményeink, amelyek leírják az otosclerosis különböző stádiumaiban a TNF- α Receptorok kifejeződését, szintén megerősítik a fentebb említett elgondolást (17). Mindemellett a jövőben még további in vitro kísérletek, valamint sejt-szövettenyésztési vizsgálatok szükségesek az elmélet igazolásához.

Napjainkban a fülsebészeti megoldások (stapedectomy, stapedotomy) az elsődleges terápiás megoldások az otosclerosisos halláscsökkenések kezelésében. Tekintve a betegség autoimmun-gyulladásos jellegzetességeit, valamint a csontanyagcsere érintettségét a pathomechanizmusban a gyógyszeres kezelések is alternatívát kínálhatnak a betegség korai, szövettanilag aktív stádiumában (112-115). A gyógyszeres kezelés magában foglalja az osteoporosis ellenes, az immunszuppresszív, valamint a gyulladás-elleni hatóanyagok alkalmazását, amelyet az irodalmi áttekintés c. fejezetben már részletesebben ismertettünk.

Kísérleteink eredményei igazolják a TNF- α és receptorainak (TNFRI/TNFRII) központi szerepét az otosclerosis során lejátszódó kóros gyulladásos csontremodellációban. A gyulladásos cytokinek, beleértve a TNF- α -t is jelentős mennyiségben termelődnek az otosclerosisos csontszövetben. Ezért az anti TNF- α biológiai szerek lokális vagy szisztémás alkalmazása terápiás opciót jelenthet az otosclerosis szenzorineurális halláscsökkenéssel kísért korai, aktív, gyulladásos szakaszában (75,116) (18. ábra). Napjainkban egyetlen tanulmány foglalkozott a lokális infliximab perfúzió hatásaival autoimmun eredetű szenzorineurális halláscsökkenések (autoimmune inner ear disease – AIED) esetében (93). Ebben a kísérletben 9 AIED-ben szenvedő beteget vizsgáltak, akiknél nem volt kortikoszteroid kezelés, vagy ha volt is, akkor a kezelés végeztével relapsus alaklt ki. A pácienseknek négy hétig hetente egyszer adták az infliximab infúziót (93). Az audiológiai paraméterek minden beteg esetében javultak, s az infliximab kezelést követően a TNF- α blokkoló elhagyása után sem volt már szükséges a kortikoszteroidok alkalmazása (93). A vizsgált 9 beteg közül 7 esetben tapasztalták az audiológiai leletek teljes remisszióját a kezelés végeztével (93). A rövid-távú rekombináns OPG (OPG-Fc) kezelésnek szintén erőteljes, potenciálisan antiosteolyticus hatása lehet az állatkísérletek tanulsága alapján, leginkább az otosclerosis korai szakaszában (74,117). A kezelés hatására a RANK-mediálta osteolysis gátlásával az otosclerosisos szövetekben ismét visszaállítható a normális csontremodelláció (74,117) (18. ábra). A csontanyagcsere regulációjának szempontjából a biszfoszfonátok alkalmazása is számításba jöhet, mivel ezek a szerek erős, potenciális gátlószerei a bone morphogenetic protein (BMP) szintézisének. A biszfoszfonát kezelés hatékonyságát az otosclerosis kezdeti stádiumában már néhány klinikai előtanulmány eredményei igazolták (94,95). Példaként említhetjük *Brookler* és *Tanyeri* tanulmányát, amelyben bemutatták az etidronát kezelés hatásosságát az otosclerosis során fellépő szenzorineurális halláscsökkenés kezelésében (95). A jelenleg rendelkezésünkre álló információk alapján az anti-TNF- α szerek azok, amelyek a legnagyobb specifitással bírnak,

ennek köszönhetően a leghatékonyabb módon képesek az otosclerosisban tapasztalható csontremodellációs zavarok gátlására.



18. ábra: A csontanyagcsere regulátorainak szerepe, valamint a lehetséges gátlási pontok az otosclerosis különböző szövettani stádiumai közötti átmenetben.

Az ábra forrása: Csomor P., Sziklai I., Karosi T. TNF-alpha receptor expression correlates with histological activity of otosclerosis. *Otol Neurotol*, 2009; 30(8):1131-1137.

(A szerzők hozzájárulásával)

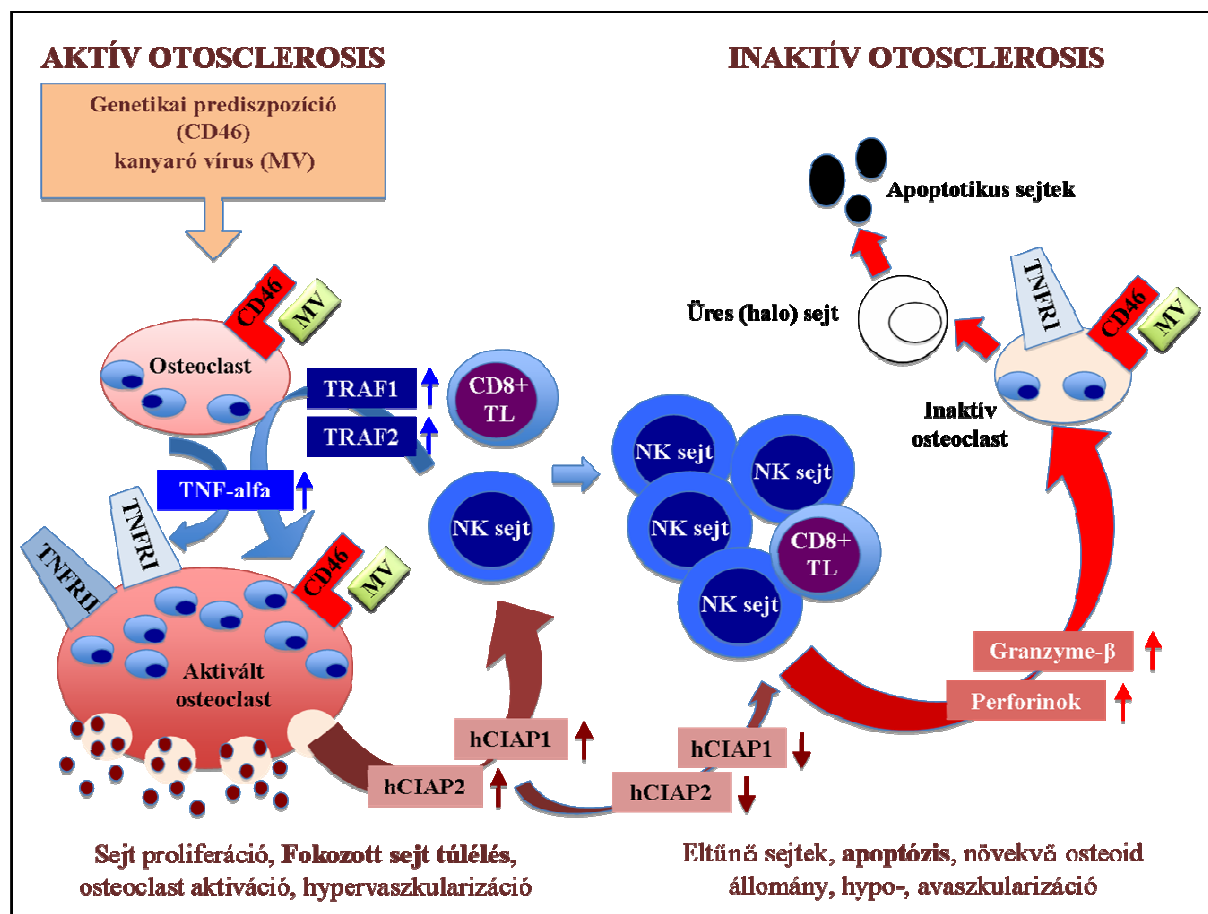
Az apoptózis markerek vizsgálatával kapott eredményeink további információkkal szolgálnak az otosclerosis pathogenezisét illetően, valamint a betegség aktív és inaktív szövettani szakaszai közötti átmenet molekuláris hátterére vonatkozóan. Az aktív otosclerosisban tapasztalható kóros csontremodelláció pathogenetikai háttere mind a mai napig tisztázatlan. Ezt a problémát különösen nehéz tisztázni az emberi capsula otica anyagcseréjének speciális sajátosságait figyelembe véve. Ezeket a csont metabolizmusra jellemző sajátosságokat (elmeszesedés egy év elteltével, nincs csont „turnover”) már ebben a fejezetben is érintettük a TNF- α receptorok vizsgálatából származó eredményeink értelmezésénél (87). Az otosclerosis kialakulásában feltehetően genetikai faktorok is részt vesznek, de az öröklésmenet meghatározása még mindig megoldatlan probléma maradt (28,36).

A legtöbb epidemiológiai tanulmányban, amelyekben populációgenetikai vizsgálatokat is végeztek a családirag halmozódó stapes ankylosis penetranciáját 40-45%-osra teszik, autoszómális domináns öröklésmenetet feltételezve (30,32,36). A genetikai kapcsoltsági viszonyok vizsgálatán (linkage analysis) alapuló tanulmányok eredményei alapján nyolc lókuszt jelenlétét feltételezik, amelyek az otosclerosishoz köthetőek (OTSC1, OTSC2, OTSC3, OTSC4, OTSC5, OTSC6, OTSC7, OTSC8), amelyek a 15q, 7q, 6p, 16q, 3q, 6q, és 9p kromoszómákon lokalizálhatóak (20,21). Noha ezeket a lókusztokat már sikerült feltérképezni, azonban nem sikerült azonosítani olyan speciális géneket (és azok fehérje termékeit), amelyek a fentebb említett a pozíciókban helyezkednek el, és szerepük lehetne az otosclerosis pathogenezisében (30,32,36). Ezeknek a genetikai tanulmányoknak van egy sarkallatos hibája, mégpedig az, hogy a különböző szerzők a genetikai kapcsoltsági vizsgálatok során az összes stapes ankylosisos beteget otosclerosisosnak tekintették anélkül, hogy elvégezték volna a szövettani vizsgálatukat, amely nélkülözhetetlen az otosclerosis korrekt diagnózisához (28,30,32,36). Ahogy azt már az irodalmi áttekintés c. fejezetben is tárgyaltuk a monogénes öröklésmenetet feltételező elméleteknek van jó néhány gyenge pontja, ezek közül csak néhányra térnénk itt ki. Az egyik ilyen, hogy miért nem jelentkeznek a tünetek már gyermekkorban, miért csak később a fiatal felnőttkorban? A másik hasonlóan problémás kérdés, hogy egy komplex háttérű gyulladásos osteolyticus folyamatot hogyan határozhat meg egyetlen gén mutációja? Ezt továbbgondolva érthető, hogy kísérleteink eredményeként miért egy komplex szabályozó rendszer zavarát észleljük, nem pedig a monogénes elméletek szerinti egyetlen géntermék kóros funkcióját tapasztaljuk.

A CD46 (kanyaróvírus receptor) alternatív splicing következtében létrejövő izoformáinak változatos expressziója tűnik a legelfogadhatóbb magyarázatnak a betegség genetikai hátterére és a szervspecifitására vonatkozóan (50). *Karosi és mtsai* négy eddig ismeretlen CD46 variánst mutattak ki otosclerosisos szövetekből (os1, os2, os3, os4) (50). Ezek az újonnan leírt otosclerosis-specifikus izoformák vagy rövidebb transzmembrán doménnel rendelkeznek, vagy a molekula ezen része hiányzik belőlük (50). Mindemellett a ritkább citoplazmatikus domént tartalmazzák. Ez kóros intracelluláris szignalizációs folyamatokat eredményezhet az érintett sejtekben, mialatt a CD46 molekula víruskötő képessége változatlan marad (50). Ez azzal magyarázható, hogy a receptor víruskötő képességét meghatározó domén a molekula konzervatív régiójában található, amelyet nem érint a polimorfizmus hátterében álló alternatív splicing (50). Feltételezhetjük, hogy a legfontosabb etiológiai tényező az otosclerosis pathogenezisében a következményes

autoimmun reakció, amely a celluláris immunitás folyamatos vírus antigén stimulációjának eredménye (41,87).

Az apoptózis markerek immunofluoreszcens vizsgálatával kapott eredményeink jól illeszkednek a másik két kísérletsorozatból származó eredményeinkhez. Mindezek figyelembe vételével egy komplexebb képet kaphatunk a betegség hátterében meghúzódó molekuláris biológiai szabályozó folyamatok zavaráról. A hCIAP1 és a hCIAP2 apoptózis inhibitor fehérjék fokozott expressziója tekinthető egyfajta molekuláris válaszreakciónak a szervezet részéről a fokozott TNF-alfa felszabadulásra, amelyet az osteoclastok és az NK-sejtek termelnek a betegség korai szakaszában. A TNF- α miután hozzákötődött a receptoraihoz (TNFRI/II) aktiválja a TNF- α receptorokhoz köthető faktorokat (TRAF1 és TRAF2), amelyek a különböző „death” doménekhez kapcsolódva ezek aktivációjával elindítják az apoptotikus folyamatokat. Az apoptózis inhibitor fehérjék (hCIAP1, hCIAP2) nem lépnek közvetlen kölcsönhatásba a TNF- α -val, vagy a TNF- α receptorokkal, azonban ezek biológiai hatását közvetve a TRAF1 és TRAF2 szabályozó molekulák inaktiválásával képesek gátolni (66). A hCIAP1 és hCIAP2 direkt módon képesek kötődni a TNFR receptorok által aktivált kaszpáz 3 és kaszpáz 7 effektor molekulákhoz, és képesek gátolni ezek proteolitikus aktivitását (118). Az apoptózis inhibitorok fokozott (normálistól eltérő) expressziója a sejtek fokozott túlélését, proliferációját, kiterjedt osteoclast aktivációt eredményez (19. ábra). Ahogy azt már korábban többen is leírták, egy átlagos aktív otosclerosisos góc életideje hozzávetőlegesen 5-7 év közé tehető (87). Ezen periódus során a TNF- α által regulált és az ennek következtében fokozottan expresszáldott hCIAP molekulák jelenlétében a hosszan elhúzódó apoptotikus folyamatok mennek végbe. Ezt a szövettani felvételeken a csökkent vascularisatio és az osteoclastok csökkent aktivitása jelzi számunkra (19. ábra). Az osteoid állomány mennyisége megnő, és végül az osteolyticus lacunák és a pseudovascularis terek pedig összeszűkülnek. Az aktivált NK-sejtek és a CD8⁺ cytotoxikus T-lymphociták további akkumulációja figyelhető meg a csökkenő aktivitású otosclerosisos góc perivascularis tereiben. A betegség ezen fázisa a szövettani értelemben gyógyult („histological healing”) állapot, azonban molekuláris szinten komoly sejtkárosodás figyelhető meg. Ez a destrukció az NK-sejtekből és a cytotoxikus T-sejtekből felszabaduló Granzyme- β -nak és a perforinoknak tulajdonítható (19. ábra). A cement vonalak koncentrikus és fonatos mintázata mindeközben lamellárisává válik, ami az inaktív otosclerosisra jellemző. A fokozott csontremodelláció végpontja a meszesedéssel és az osteoid állomány avascularizációjával járó apoptotikus sejthalál a „kiégett” (burnout) otosclerosis, amikor már semmilyen remodellációs folyamat nem zajlik (19. ábra).



19. ábra: Az apoptotikus mediátorok (hCIAP-1; hCIAP-2; Granzyme-β) szerepe az otosclerosis szövettanilag aktív és inaktív szakasza közötti átmenetben. Az aktív otosclerosisra az NK-sejtek és a CD8⁺ T-lymphociták által termelt TNF-α és TRAF felszabadulása jellemző, ami osteoclast aktivációhoz, a sejtek fokozott túléléséhez és hipervascularisatiohoz vezet. Az aktivált osteoclastok fokozódó TNF-α termelése és szekréciója további osteoclast precursor sejtek toborzását eredményezi. A sejtek túlélését negatív „feedback” folyamatként az apoptózis inhibitor fehérjék fokozódó expressziója biztosítja, ezek a fehérjék a TNF-α által indukált apoptózis gátlásával biztosítják a sejtek túlélését, proliferációját. Az inaktív otosclerosist jelentős mennyiségű avascularizált osteoid alapállomány jellemzi, amelyből már eltűntek az osteoclastok. Az aktivált immunsejtek akkumulációja és fokozott Granzyme-β és perforin szekréciója a célsejtek apoptózist eredményezi, ami az otosclerosis folyamat kiégéséhez vezet.

Rövidítések: CD8⁺ TL: CD8⁺ T-lymphocita; CD46: kanyaróvírus receptor; hCIAP-1: human cellular inhibitor of apoptosis 1; hCIAP-2: human cellular inhibitor of apoptosis 2; MV: kanyaróvírus (measles virus); NK-sejt: natural killer sejt; TNFR1: I típusú TNF-α receptor; TNFR2: II típusú TNF-α receptor; TRAF1: TNF-α associated factor 1; TRAF2: TNF-α associated factor 2.

Az ábra forrása: Csomor P., Sziklai I., Liktör B., Z. Szabó L., Pytel J., Jóri J., Karosi T. Otosclerosis: disturbed balance between cell survival and apoptosis. *Otol Neurotol*, 2010; 31(6):867-874. (A szerzők hozzájárulásával)

ÖSSZEFOGLALÁS

Elméleti háttér: A stapes fixációk etiopathogenetikai háttere eltérő lehet, közülük egy a mai napig tisztázatlan maradt. Az otosclerosis a capsula otica csontremodellációs zavara, aminek következtében a stapes talp rögzülése és a cochleában zajló endostealis osteolysis eredményeként progresszív vezetékes-és/vagy szenzineurális halláscsökkenés alakul ki.

Anyagok és módszerek: Ez a tanulmány három kísérleten alapszik: **1.** A stapes talpakat szövettani és molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáltuk. Az RNS-t kivontuk a mintákból. A kanyaróvírus kimutatását egy nukleoprotein RNS-specifikus RT-PCR segítségével végeztük el. Az alternatív splicing-on átment CD46 izoformák RNS-ét RT-PCR segítségével amplifikáltuk, az amplimereket poliakrilamid gélelektroforézissel elkülönítettettük, a gélből kinyertük az egyes variánsokat. Az amplimereket olyan restrikciós enzimekkel hasítottuk, amelyeknek a CD46-ra specifikus felismerőhelyeik vannak. A kanyaróvírus ellenes IgG szinteket ELISA segítségével határoztuk meg. **2.** A stapes talpakat haematoxylin-eozin festéssel és TNFRI/II specifikus immunfluoreszcens assay-el vizsgáltuk. **3.** A stapes talpakat haematoxylin-eozin festéssel és hCIAP1/2, és Granzyme- β specifikus immunfluoreszcens assay-el vizsgáltuk. **Eredmények:** A kanyaróvírus RNS-t csak otosclerosisos mintákból sikerült kimutatni. Mintáink öt CD46 variáns expressziójával voltak jellemezhetőek (c, d, e, f, és egy ismeretlen variáns). Otosclerosisos mintáknál az „f” és az ismeretlen variáns fokozott expresszióját észleltük. A kanyaró-ellenes IgG szint alacsonyabb volt otosclerosisos betegeknél, mint a nem-otosclerosisosoknál. Az aktív otosclerosisos esetekben a TNFRII fokozottan, a TNFRI mérsékelten expresszáldott. Az inaktív otosclerosisos esetekben a TNFRI permanensen kifejeződött, de a TNFRII expressziója elenyésző volt. A kontroll mintáknál a TNF- α receptorok alig fejeződtek ki. Aktív otosclerosisos mintáknál a hCIAP1/2 markánsan, a Granzyme- β alig expresszáldott. Az inaktív otosclerosisos mintáknál a Granzyme- β erőteljesen, a hCIAP1/2 elhanyagolhatóan expresszáldott. A kontroll mintáknál nem volt számottevő Granzyme- β immunreakció, s az apoptózis inhibitorok is csak mérsékelten fejeződtek ki. **Megbeszélés:** Az „f” variáns és az ismeretlen rövid variáns fokozott expressziója valamint a capsula otica speciális CD46 expressziós mintázata megváltozott, vagy kóros sejten belüli jelátviteli folyamatokat eredményezhet, lehetőséget adva a perzisztáló kanyaróvírus fertőzés kialakulásának. Az otosclerosisot kísérő fokozott TNF- α receptor expresszió igazolja az aktivált osteoclastok intenzív anyagcseréjének és a gyulladásos reakcióutaknak a szerepét. Az otosclerosis szövettanilag aktív és inaktív szakaszában az apoptózis inhibitorok és inducereik expressziója ellentétes, ez a sejtek túlélésének/apoptózisának szabályozási zavarait feltételezi az otosclerosisban.

SUMMARY

Background: The etiopathogenesis of stapes fixations is different, one of them still remained unclear. Otosclerosis is a bone remodelling disorder of the human otic capsule, that leads to progressive and sensorineural hearing loss as a consequence of stapes footplate fixation and cochlear bone resorption with endosteal involvement. **Materials and methods:** This study based on three experiment: **1.** Stapes footplates were analyzed by histopathological and molecular biological methods. Nucleic acids were extracted. Measles virus was detected by nucleoprotein RNA-specific RT-PCR. Alternatively spliced RNA of CD46 isoforms was amplified by RT-PCR; cDNA amplimers were separated by poly-acrylamide gel electrophoresis and were purified from the gel. Amplimers of CD46 isoforms was restricted by endonuclease enzymes having CD46-specific recognition sites. Anti-measles IgG serum levels were measured by ELISA. **2.** Stapes footplates were analyzed by haematoxylin-eosin staining and TNFRI/II specific immunofluorescent assay was performed. **3.** Stapes footplates were analyzed by haematoxylin-eosin staining and hCIAP1/2 and Granzyme- β specific immunofluorescent assays were performed. **Results:** The presence of measles virus was associated only with the histological diagnosis of otosclerosis. All specimens were characterized by the expression of five CD46 variants (c, d, e, f and one unknown isoform). Otosclerotic specimens were featured by increased expression levels of variant 'f' and the unknown isoform. Anti-measles IgG levels were lower in the sera of patients with otosclerosis in contrast to the nonotosclerotic stapes fixations. Active otosclerosis was featured by increased expression of TNFRII and moderate expression of TNFRI; inactive cases were characterized by permanent expression of TNFRI; however, TNFRII-specific immunoreaction was absent. Nonotosclerotic stapes specimens showed a negligible TNFR expression. Active otosclerosis was featured by robust expression of hCIAP1/2 and negligible expression of Granzyme- β . Inactive cases of otosclerosis showed inverse reaction: Granzyme- β was highly expressed; however, hCIAP1/2 specific immunoreactions were absent. Nonotosclerotic and normal stapes specimens showed no considerable Granzyme- β expression and moderate hCIAP1/2 expression. **Conclusion:** Increased expression levels of the variant 'f' and the unknown shorter isoform as well as the special CD46 expression pattern of the human otic capsule might produce modified or pathological intracellular signalization that could create the possibility of persistent measles virus infection. Detection of elevated TNFR expression demonstrates activated osteoclast metabolism and inflammatory pathways in otosclerosis. Detection of the inversely expressed apoptosis inhibitors and inducers in active and inactive stages of otosclerosis demonstrates pathologic regulation of cell survival and apoptosis.

ÚJ MEGFIGYELÉSEK

1. A szövettani vizsgálat eredményétől függetlenül, minden mintát ugyanazon öt CD46 variáns együttes expresszója jellemzett (c, d, e, f, és egy rövidebb ismeretlen izoforma). A szövettanilag otosclerosisosnak véleményezett mintákat az „f” variáns és az ismeretlen rövid variáns kifejezetten emelkedett expressziója jellemezte. A fenti két CD46 izoforma fokozott kifejeződése és az oticus capsula egyedi CD46 expressziós mintázata megváltozott, illetve kóros intracelluláris jelátvitelt eredményezhet a kanyaróvírus receptorok szintjén. Ezek a változások a következményes immunológiai eltérésekkel együtt, magyarázhatják a perzisztáló kanyaróvírus fertőzés oticus capsulán belüli kialakulását.
2. Az otosclerosisban tapasztalható csökkent kanyaróvírus ellenes IgG szint kimutatása ELISA technikával.
3. Az otosclerosist kísérő fokozott TNF- α receptor expresszió igazolja az aktivált osteoclastok intenzív anyagcseréjének és a gyulladásos reakcióutaknak a szerepét a betegség pathogenezisében. A TNF- α központi szerepet játszik a betegség kezdeti és a késői szakasza közötti átmenetben. Ezért fontos terápiás célpont lehet, a betegség korai, aktív fázisában.
4. Az otosclerosis szövettanilag aktív és inaktív szakaszában az apoptózis inhibitorok (hCIAP1, hCIAP2) és inducereket (Granzyme- β) expressziója ellentétes, ez a sejtek túlélésének/apoptózisának szabályozási zavarait feltételezi az otosclerosisban. A vizsgált apoptózis inhibitoroknak és inducereket szintén kulcsfontosságú szerepe van a betegség aktív és inaktív szakasza közötti átmenetben különös tekintettel annak időbeni lefolyására.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Iyer PV, Gristwood RE. Histopathology of the stapes in otosclerosis. *Pathology*. **16**, 30-38, 1984.
2. Wang PC, Merchant SN, McKenna MJ, Glynn RJ, Nadol JB Jr. Does otosclerosis occur only in the temporal bone? *Am J Otol*. **20**, 162-165, 1999.
3. Declau F, Van Spaendonck M, Timmermans JP, Michaels L, Liang J, Qiu JP, Van de Heyning P. Prevalence of otosclerosis in an unselected series of temporal bones. *Otol Neurotol*. **22**, 596-602, 2001.
4. Linthicum FH Jr. Histopathology of otosclerosis. *Otolaryngol Clin North Am*. **26**, 335-352, 1993.
5. Michaels L. The temporal bone: an organ in search of a histopathology. *Histopathology*. **18**, 391-394, 1991.
6. Gros A, Vatovec J, Sereg-Bahar M. Histologic changes on stapedial footplate in otosclerosis. Correlations between histologic activity and clinical findings. *Otol Neurotol*. **24**, 43-47, 2003.
7. Schuknecht HF, Barber W. Histologic variants in otosclerosis. *Laryngoscope*. **95**, 1307-1317, 1985.
8. Karosi T, Kónya J, Petkó M, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J, Sziklai I. Two subgroups of stapes fixation: otosclerosis and pseudo-otosclerosis. *Laryngoscope*. **115**, 1968-1973, 2005.

9. Karosi T, Kónya J, Petkó M, Sziklai I. Histologic otosclerosis is associated with the presence of measles virus in the stapes footplate. *Otol Neurotol.* **26**, 1128-1133, 2005.
10. Stankovic KM, McKenna MJ. Current research in otosclerosis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* **14**, 347-351, 2006.
11. Ye SN, Yi ZX, Wang PY, Jiang SC. The role and significance of chondroitin sulfate in the development of otosclerosis. *Laryngoscope.* **105**, 1005-1009, 1995.
12. Niedermeyer HP, Becker ET, Arnold W. Expression of collagens in the otosclerotic bone. *Adv Otorhinolaryngol.* **65**, 45-49, 2007.
13. Arnold W, Friedmann I. Immunohistochemistry of otosclerosis. *Acta Otolaryngol Suppl.* **470**, 124-128, 1990.
14. Altermatt HJ, Gerber HA, Gaeng D, Müller C, Arnold W. Immunohistochemical findings in otosclerotic lesions. *HNO.* **40**, 476-479, 1992.
15. Schrader M, Poppendieck J, Weber B. Immunohistologic findings in otosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* **99**, 349-352, 1990.
16. Karosi T, Jókay I, Kónya J, Petkó M, Szabó LZ, Sziklai I. Expression of measles virus receptors in otosclerotic, non-otosclerotic and in normal stapes footplates. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* **264**, 607-613, 2007.
17. Karosi T, Jókay I, Kónya J, Petkó M, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J, Sziklai I. Activated osteoclasts with CD51/61 expression in otosclerosis. *Laryngoscope.* **116**, 1478-1484, 2006.

18. Szekanecz Z, Szekanecz E, Morvai K, Rácz T, Szegedi G, Sziklai I. Current aspects of the pathogenesis and clinical characteristics of otosclerosis: possibilities of drug therapy. *Hung Med J (Orv Hetil)* **140**, 2435-2440, 1999.
19. McKenna MJ, Kristiansen AG, Bartley ML, Rogus JJ, Haines JL. Association of COL1A1 and otosclerosis: evidence for a shared genetic etiology with mild osteogenesis imperfecta. *Am J Otol.* **19**, 604-610, 1998.
20. McKenna MJ, Kristiansen AG, Tropitzsch AS. Similar COL1A1 expression in fibroblasts from some patients with clinical otosclerosis and those with type I osteogenesis imperfecta. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* **111**, 184-189, 2002.
21. McKenna MJ, Nguyen-Huynh AT, Kristiansen AG. Association of otosclerosis with Sp1 binding site polymorphism in COL1A1 gene: evidence for a shared genetic etiology with osteoporosis. *Otol Neurotol.* **25**, 447-450, 2004.
22. Clayton AE, Mikulec AA, Mikulec KH, Merchant SN, McKenna MJ. Association between osteoporosis and otosclerosis in women. *J Laryngol Otol.* **118**, 617-621, 2004.
23. Rodríguez L, Rodríguez S, Hermida J, Frade C, Sande E, Visedo G, Martín C, Zapata C. Proposed association between the COL1A1 and COL1A2 genes and otosclerosis is not supported by a case-control study in Spain. *Am J Med Genet A.* **128**, 19-22, 2004.
24. Chen W, Meyer NC, McKenna MJ, Pfister M, McBride DJ Jr, Fukushima K, Thys M, Camp GV, Smith RJ. Single-nucleotide polymorphisms in the COL1A1 regulatory regions are associated with otosclerosis. *Clin Genet.* **71**, 406-414, 2007.

25. Van Den Bogaert K, Govaerts PJ, De Leenheer EM, Schatteman I, Verstreken M, Chen W, Declau F, Cremers CW, Van De Heyning PH, Offeciers FE, Somers T, Smith RJ, Van Camp G. Otosclerosis: a genetically heterogeneous disease involving at least three different genes. *Bone*. **30**, 624-630, 2002.
26. Van Den Bogaert K, Govaerts PJ, Schatteman I, Brown MR, Caethoven G, Offeciers FE, Somers T, Declau F, Coucke P, Van de Heyning P, Smith RJ, Van Camp G. A second gene for otosclerosis, OTSC2, maps to chromosome 7q34-36. *Am J Hum Genet*. **68**, 495-500, 2001.
27. Bel Hadj Ali I, Thys M, Beltaief N, Schrauwen I, Hilgert N, Vanderstraeten K, Dieltjens N, Mnif E, Hachicha S, Besbes G, Ben Arab S, Van Camp G. A new locus for otosclerosis, OTSC8, maps to the pericentromeric region of chromosome 9. *Hum Genet*. **123**, 267-272, 2008.
28. Alzoubi FQ, Ollier WR, Ramsden RT, Saeed SR. No evidence of linkage between 7q33-36 locus (OTSC2) and otosclerosis in seven British Caucasian pedigrees. *J Laryngol Otol*. **121**, 1140-1147, 2007.
29. Thys M, Van Den Bogaert K, Iliadou V, Vanderstraeten K, Dieltjens N, Schrauwen I, Chen W, Eleftheriades N, Grigoriadou M, Pauw RJ, Cremers CR, Smith RJ, Petersen MB, Van Camp G. A seventh locus for otosclerosis, OTSC7, maps to chromosome 6q13-16.1. *Eur J Hum Genet*. **15**, 362-368, 2007.
30. Brownstein Z, Goldfarb A, Levi H, Frydman M, Avraham KB. Chromosomal mapping and phenotypic characterization of hereditary otosclerosis linked to the OTSC4 locus. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. **132**, 416-424, 2006.

31. Tomek MS, Brown MR, Mani SR, Ramesh A, Srisailapathy CR, Coucke P, Zbar RI, Bell AM, McGuirt WT, Fukushima K, Willems PJ, Van Camp G, Smith RJ. Localization of a gene for otosclerosis to chromosome 15q25-q26. *Hum Mol Genet.* **7**, 285-290, 1998.
32. Ealy M, Chen W, Ryu GY, Yoon JG, Welling DB, Hansen M, Madan A, Smith RJ. Gene expression analysis of human otosclerotic stapedial footplates. *Hear Res.* **240**, 80-86, 2008.
33. Moumoulidis I, Axon P, Baguley D, Reid E. A review on the genetics of otosclerosis. *Clin Otolaryngol.* **32**, 239-247, 2007.
34. Norrby E., Oxman M.N. Measles Virus. In: Fields B.N., Knipe D.M., eds. *Fields Virology*. New York: Raven Press, 1013-1044, 1990.
35. Arnold W, Friedmann I. Otosclerosis--an inflammatory disease of the otic capsule of viral aetiology? *J Laryngol Otol.* **102**, 865-871, 1988.
36. McKenna MJ, Mills BG. Ultrastructural and immunohistochemical evidence of measles virus in active otosclerosis. *Acta Otolaryngol Suppl.* **470**, 130-140, 1990.
37. Niedermeyer HP, Arnold W, Schuster M, Baumann C, Kramer J, Neubert WJ, Sedlmeier R. Persistent measles virus infection and otosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* **110**, 897-903, 2001.
38. Arnold W, Niedermeyer HP, Lehn N, Neubert W, Höfler H. Measles virus in otosclerosis and the specific immune response of the inner ear. *Acta Otolaryngol.* **116**, 705-709, 1996.

39. *Niedermeyer HP, Arnold W.* Otosclerosis: a measles virus associated inflammatory disease. *Acta Otolaryngol.* **115**, 300-303, 1995.
40. *McKenna MJ, Mills BG.* Immunohistochemical evidence of measles virus antigens in active otosclerosis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* **101**, 415-421, 1989.
41. *Lolov S, Edrev G, Kyurkchiev S.* Antimeasles immunoglobulin G and virus-neutralizing activity in sera of patients with otosclerosis. *Adv Otorhinolaryngol.* **65**, 107-113, 2007.
42. *Karosi T, Kónya J, Petkó M, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J, Sziklai I.* Antimeasles immunoglobulin g for serologic diagnosis of otosclerotic hearing loss. *Laryngoscope.* **116**, 488-493, 2006.
43. *McKenna MJ, Kristiansen AG, Haines J.* Polymerase chain reaction amplification of a measles virus sequence from human temporal bone sections with active otosclerosis. *Am J Otol.* **17**, 827-830, 1996.
44. *Karosi T, Kónya J, Szabó LZ, Sziklai I.* Measles virus prevalence in otosclerotic stapes footplate samples. *Otol Neurotol.* **25**, 451-456, 2004.
45. *Gantumur T, Niedermeyer HP, Neubert WJ, Arnold W.* Molecular detection of measles virus in primary cell cultures of otosclerotic tissue. *Acta Otolaryngol.* **126**, 811-816, 2006.
46. *Grayeli AB, Palmer P, Tran Ba Huy P, Soudant J, Sterkers O, Lebon P, Ferrary E.* No evidence of measles virus in stapes samples from patients with otosclerosis. *J Clin Microbiol.* **38**, 2655-2660, 2006.

47. Komune N, Ohashi M, Matsumoto N, Kimitsuki T, Komune S, Yanagi Y. No evidence for an association between persistent measles virus infection and otosclerosis among patients with otosclerosis in Japan. *J Clin Microbiol.* **50**, 626-32, 2012.
48. Emery SB, Meyer A, Miller L, Lesperance MM. Otosclerosis or congenital stapes ankylosis? The diagnostic role of genetic analysis. *Otol Neurotol* **30**, 1204-8. 2009.
49. Usami S, Abe S, Nishio S, Sakurai Y, Kojima H, Tono T, Suzuki N. Mutations in the NOG gene are commonly found in congenital stapes ankylosis with symphalangism, but not in otosclerosis. *Clin Genet* [epub ahead of print] 2012.
50. Karosi T, Szalmás A, Csomor P, Kónya J, Petkó M, Sziklai I. Disease-associated novel CD46 splicing variants and pathologic bone remodeling in otosclerosis. *Laryngoscope.* **118**, 1669-1676, 2008.
51. Yoo TJ. Etiopathogenesis of otosclerosis: a hypothesis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* **93**, 28-33, 1984.
52. Sølvsten Sørensen M, Nielsen LP, Bretlau P, Jørgensen MB. The role of type II collagen autoimmunity in otosclerosis revisited. *Acta Otolaryngol.* **105**, 242-247, 1988.
53. Lolov SR, Edrev GE, Kyurkchiev SD, Kehayov IR. Elevated autoantibodies in sera from otosclerotic patients are related to the disease duration. *Acta Otolaryngol.* **118**, 375-380, 1998.

54. Joliat T, Seyer J, Bernstein J, Krug M, Ye XJ, Cho JS, Fujiyoshi T, Yoo TJ. Antibodies against a 30 kilodalton cochlear protein and type II and IX collagens in the serum of patients with inner ear diseases. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* **101**, 1000-1006, 1992.
55. Bujía J, Alsalameh S, Jerez R, Sittinger M, Wilmes E, Burmester G. Antibodies to the minor cartilage collagen type IX in otosclerosis. *Am J Otol.* **15**, 222-224, 1994.
56. Helfgott SM, Mosciski RA, San Martin J, Lorenzo C, Kieval R, McKenna M, Nadol J, Trentham DE. Correlation between antibodies to type II collagen and treatment outcome in bilateral progressive sensorineural hearing loss. *Lancet.* **337**, 387-389, 1991.
57. Yoo TJ, Shea JJ Jr, Floyd RA. Enchondral cartilage rests collagen-induced autoimmunity: a possible pathogenetic mechanism of otosclerosis. *Am J Otolaryngol.* **8**, 317-324, 1987.
58. Harris JP, Woolf NK, Ryan AF. A reexamination of experimental type II collagen autoimmunity: middle and inner ear morphology and function. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* **95**, 176-180, 1986.
59. Jesić S, Radulović R, Arsović N. Altered immunoregulations in otosclerosis: presence of autoantibodies in otosclerotic sera samples. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* **254 Suppl 1**, S50-52, 1997.
60. Thys M, Schrauwen I, Vanderstraeten K, Janssens K, Dieltjens N, Van Den Bogaert K, Fransen E, Chen W, Ealy M, Claustres M, Cremers CR, Dhooge I, Declau F, Claes J, Van de Heyning P, Vincent R, Somers T, Offeciers E, Smith

- RJ, Van Camp G. The coding polymorphism T263I in TGF-beta1 is associated with otosclerosis in two independent populations. *Hum Mol Genet.* **16**, 2021-2030, 2007.
61. Thys M, Schrauwen I, Vanderstraeten K, Dieltjens N, Fransen E, Ealy M, Cremers CW, van de Heyning P, Vincent R, Offeciers E, Smith RH, van Camp G. Detection of Rare Nonsynonymous Variants in TGFB1 in Otosclerosis Patients. *Ann Hum Genet.* **73**, 171-5, 2009.
 62. Bodo M, Venti G, Baroni T, Bellucci C, Giammarioli M, Donti E, Paludetti G, Stabellini G, Carinci P. Phenotype of in vitro human otosclerotic cells and its modulation by TGF beta. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* **41**, 1039-1049, 1995.
 63. Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL, et al. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF-alpha-mediated NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 11778-83. 2008.
 64. Bertrand MJ, Doiron K, Labbé K, Korneluk RG, Barker PA, Saleh M. Cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors NOD1 and NOD2. *Immunity.* **30**, 789-801, 2009.
 65. Jin HS, Lee DH, Kim DH, Chung JH, Lee SJ, Lee TH. cIAP1, cIAP2, and XIAP act cooperatively via nonredundant pathways to regulate genotoxic stress-induced nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res.* **69**, 1782-91. 2009.
 66. Reardon C, Mark TW. cIAP preteins: keystones in NOD receptor signal transduction. *Immunity.* **30**: 789-801. 2009.

67. Conte D, Holcik M, Lefebvre CA, et al. Inhibitor of apoptosis protein cIAP2 is essential for lipopolysaccharide-induced macrophage survival. *Mol Cell Biol* **26**, 699-708. 2006.
68. Vince JE, Pantaki D, Feltham R, et al. TRAF2 must bind to cIAPs for TNF to efficiently activate NF- κ B and to prevent TNF induced apoptosis. *J Biol Chem*. **284**: 35906-15. 2009.
69. Chen G, Goeddel DV. TNF-RI signalling: a beautiful pathway. *Science* **296**,1634-5, 2002.
70. Karin M, Gallagher E. TNFR signalling: ubiquitin-conjugated TRAFfic signals control stop-and-go for MAPK signalling complexes. *Immunol Rev*. **228**, 225-40. 2009.
71. McKenna MJ, Kristiansen AG. Molecular biology of otosclerosis. *Adv Otorhinolaryngol*. **65**, 68-74, 2007.
72. Karosi T, Jókay I, Kónya J, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J, Szalmás A, Sziklai I. Detection of osteoprotegerin and TNF-alpha mRNA in ankylotic Stapes footplates in connection with measles virus positivity. *Laryngoscope*. **116**, 1427-1433, 2006.
73. Karosi T, Kónya J, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J, Szalmás A, Sziklai I. Codetection of measles virus and tumor necrosis factor-alpha mRNA in otosclerotic stapes footplates. *Laryngoscope*. **115**, 1291-1297, 2005.
74. Zehnder AF, Kristiansen AG, Adams JC, Kujawa SG, Merchant SN, McKenna MJ. Osteoprotegerin knockout mice demonstrate abnormal remodeling of the otic capsule and progressive hearing loss. *Laryngoscope*. **116**, 201-206, 2006.

75. Sziklai I. Human otosclerotic bone-derived peptide decreases the gain of the electromotility in isolated outer hair cells. *Hear Res.* **95**, 100-107, 1996.
76. Schrauwen I, Thys M, Vanderstraeten K, Franssen E, Dieltjens N, Huyghe JR, Ealy M, Claustres M, Cremers CR, Dhooge I, Declau F, Van de Heyning P, Vincent R, Somers T, Offeciers E, Smith RJ, Van Camp G. Association of bone morphogenetic proteins with otosclerosis. *J Bone Miner Res.* **23**, 507-516, 2008.
77. Lehnerdt G, Metz KA, Trellakis S, Jahnke K, Neumann A. Signaling by way of type IB and II bone morphogenetic protein receptors regulates bone formation in otospongiosis. *Laryngoscope.* **117**, 812-816, 2007. Erratum in: *Laryngoscope.* **117**, 1510, 2007.
78. Lehnerdt G, Unkel C, Metz KA, Jahnke K, Neumann A. Immunohistochemical evidence of BMP-2, -4 and -7 activity in otospongiosis. *Acta Otolaryngol.* **128**, 13-17, 2008.
79. Imauchi Y, Jeunemaître X, Boussion M, Ferrary E, Sterkers O, Grayeli AB. Relation between renin-angiotensin-aldosterone system and otosclerosis: a genetic association and in vitro study. *Otol Neurotol.* **29**, 295-301, 2008.
80. Schrauwen I, Thys M, Vanderstraeten K, Franssen E, Ealy M, Cremers CW, Dhooge I, Van de Heyning P, Offeciers E, Smith RJ, Van Camp G. No evidence for association between the renin-angiotensin-aldosterone system and otosclerosis in a large Belgian-Dutch population. *Otol Neurotol.* **30**, 1079-1083, 2009.
81. Grayeli AB, Escoubet B, Bichara M, Julien N, Silve C, Friedlander G, Sterkers O, Ferrary E. Increased activity of the diastrophic dysplasia sulfate transporter

- in otosclerosis and its inhibition by sodium fluoride. *Otol Neurotol.* 24, 854-862, 2003.
82. *Imauchi Y, Lombès M, Lainé P, Sterkers O, Ferrary E, Grayeli AB.* Glucocorticoids inhibit diastrophic dysplasia sulfate transporter activity in otosclerosis by interleukin-6. *Laryngoscope.* **116**, 1647-1650, 2006.
 83. *Grayeli AB, Sterkers O, Roulleau P, Elbaz P, Ferrary E, Silve C.* Parathyroid hormone-parathyroid hormone-related peptide receptor expression and function in otosclerosis. *Am J Physiol.* **277**, 1005-1012, 1999.
 84. *Fanó G, Venti-Donti G, Belia S, Paludetti G, Antonica A, Donti E, Maurizi M.* PTH induces modification of transductive events in otosclerotic bone cell cultures. *Cell Biochem Funct.* **11**, 257-261, 1993.
 85. *Niedermeyer HP, Arnold W.* Etiopathogenesis of otosclerosis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* **64**, 114-119, 2002.
 86. *Cureoglu S, Schachern PA, Ferlito A, Rinaldo A, Tsuprun V, Paparella MM.* Otosclerosis: etiopathogenesis and histopathology. *Am J Otolaryngol.* **27**, 334-340, 2006.
 87. *Chole RA, McKenna M.* Pathophysiology of otosclerosis. *Otol Neurotol.* **22**, 249-257, 2001.
 88. *Horner KC.* The effect of sex hormones on bone metabolism of the otic capsule - an overview. *Hear Res.* **252**, 56-60, 2008.

89. Huang CC, Yabe Y, Yan SD. Effects of indomethacin and calcitonin on bone absorption in type II collagen-induced otosclerosis-like lesions in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg.* **103**, 1002-1008, 1990.
90. Adachi K, Chole RA, Yee J. Indomethacin inhibition of middle ear bone resorption. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* **117**, 267-269, 1991.
91. Moscicki RA, San Martin JE, Quintero CH, Rauch SD, Nadol JB, Bloch KJ. Serum antibody to inner ear proteins in patients with progressive hearing loss. Correlation with disease activity and response to corticosteroid treatment. *JAMA.* **272**, 611-616, 1994.
92. Yilmaz I, Yilmazer C, Erkan AN, Aslan SG, Ozluoglu LN. Intratympanic dexamethasone injection effects on transient-evoked otoacoustic emission. *Am J Otolaryngol.* **26**, 113-117, 2005.
93. Van Wijk F, Staecker H, Keithley E, Lefebvre PP. Local perfusion of the tumor necrosis factor alpha blocker infliximab to inner ear improves autoimmune neurosensory hearing loss. *Audiol Neurotol.* **11**, 357-365, 2006.
94. Brookler K. Medical treatment of otosclerosis: rationale for use of bisphosphonates. *Int Tinnitus J.* **14**, 92-96, 2008.
95. Brookler KH, Tanyeri H. Etidronate for the the neurotologic symptoms of otosclerosis: preliminary study. *Ear Nose Throat J.* **76**, 371-376, 379-381, 1997.
96. Lacosta JL, Infante JC, Sanchez Galán L. Calcitonin and otosclerosis: a preliminary clinical note. *Acta Otolaringol Esp.* **48**, 561-564, 1997.

97. *Brookes GB*. Vitamin D deficiency and otosclerosis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* **93**, 313-321, 1985.
98. *Vartiainen E, Vartiainen J*. The effect of drinking water fluoridation on the natural course of hearing in patients with otosclerosis. *Acta Otolaryngol.* **116**, 747-750, 1996.
99. *Vartiainen E, Vartiainen J*. The influence of fluoridation of drinking water on the long-term hearing results of stapedectomy. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* **22**, 34-36, 1997.
100. *Causse JR, Causse JB, Uriel J, Berges J, Shambaugh GE Jr, Bretlau P*. Sodium fluoride therapy. *Am J Otol.* **14**, 482-490, 1993.
101. *Colletti V, Fiorino FG*. Effect of sodium fluoride on early stages of otosclerosis. *Am J Otol.* **12**, 195-198, 1991.
102. *Bretlau P, Salomon G, Johnsen NJ*. Otospongiosis and sodium fluoride. A clinical double-blind, placebo-controlled study on sodium fluoride treatment in otospongiosis. *Am J Otol.* **10**, 20-22, 1989.
103. *Iyer V, Gristwood*. Histopathology of the stapes in otosclerosis. *Pathol.* **16**, 30-38, 1984.
104. *Schneider-Schaulies S, Niewiesk, Schneide-Schaulies J, ter Meulen V*. Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms. *Curr Mol Med* **1**, 163-181. 2001.

105. Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. Activation of human CD4⁺ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* **421**, 388-392. 2003.
106. Sakauchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* **101**, 455-458. 2000.
107. Karosi T, Szekanecz Z, Sziklai I. Otosclerosis: an autoimmune disease? *Autoimmun Rev* **9**, 95-101. 2009.
108. Marie JC, Astier AL, Rivallier P, Rabourdin-Combe C, Wild TF, Horvat B. Linking innate and acquired immunity: divergent role of CD46 cytoplasmatic domains in T-cell induced inflammation. *Nature Immunol* **3**: 659-666. 2002.
109. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* **53**: 45-53. 1988.
110. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signalling by death receptors. *Eur j Biochem* **254**: 439-59. 1988.
111. Friedmann I. Pathology of the Ear. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications, 1974.
112. Taylor PC. Anti-tumor necrosis factor therapies. *Curr Opin Rheumatol* **13**: 164-69. 2001.
113. Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Tumor necrosis factor- α , an initiator, and etanercept, an inhibitor of cochlear inflammation. *Laryngoscope* **112**: 1627-34. 2002.

114. Cohen S, Shoup A, Weisman MH, Harris JP. Etanercept treatment for autoimmune inner ear disease: results of a pilot placebo-controlled study. *Otol Neurotol* **26**: 903-7. 2005.
115. Street I, Jobanputra P, Proops DW. Etanercept, a tumor necrosis factor α receptor antagonist, and methotrexate in acute sensorineural hearing loss. *J Laryngol Otol* **120**: 1064-66. 2006.
116. Wang X, Truong T, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Blockage of immune-mediated inner ear damage by etanercept. *Otol Neurotol* **24**: 52-57. 2003.
117. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad of OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodelling. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**: 457-75. 2004.
118. Wang L, Du F, Wang X. TNF-alpha induces two distinct caspase 8 activation pathways. *Cell* **133**: 693-703. 2008.

Iktatószám: DEENKÉTK/111/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Csomor Péter

Neptun kód: PMG47E

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Csomor, P.**, Sziklai, I., Liktó, B., Z. Szabó, L., Pytel, J., Jóri, J., Karosi, T.: Otosclerosis: Disturbed balance between cell survival and apoptosis.
Otol. Neurotol. 31 (6), 867-874, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MAO.0b013e3181e3dedf>
IF:2.065
2. **Csomor, P.**, Sziklai, I., Karosi, T.: TNF-[alpha] receptor expression correlates with histologic activity of otosclerosis.
Otol. Neurotol. 30 (8), 1131-1137, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MAO.0b013e3181be6af4>
IF:1.435
3. **Csomor, P.**, Szalmás, A., Kónya, J., Sziklai, I., Karosi, T.: Restriction analysis of otosclerosis-associated CD46 splicing variants.
Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 267 (2), 219-226, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-009-1042-4>
IF:1.167



További Közlemények

4. **Csomor, P.**, Liktör, B., Liktör, B., Szekanecz, Z., Sziklai, I., Karosi, T.: Expression of bone morphogenetic protein 2, 4, 5, and 7 correlates with histological activity of otosclerotic foci.
Acta Oto-Laryngol. Epub ahead of print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/00016489.2011.653669>
IF:1.2 (2010)

5. Karosi, T., **Csomor, P.**, Sziklai, I.: Tumor necrosis factor-alfa receptor expression correlates with mucosal changes and biofilm presence in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis.
Laryngoscope. 122 (3), 504-510, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/lary.23190>
IF:2.096 (2010)

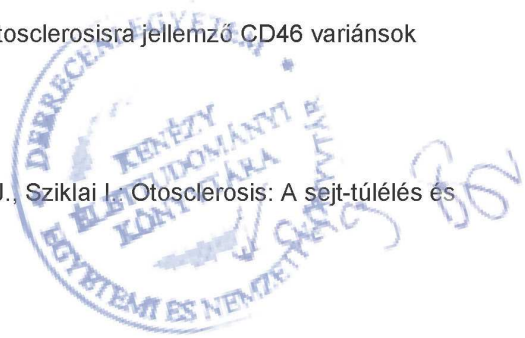
6. **Csomor, P.**, Liktör, B., Liktör, B., Sziklai, I., Karosi, T.: No evidence for disturbed COL1A1 and A2 expression in otosclerosis.
Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryn. Epub ahead of print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-011-1859-5>
IF:1.214 (2010)

7. **Csomor, P.**, Sziklai, I., Karosi, T.: Controversies in RELN/reelin expression in otosclerosis.
Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryn. 269 (2), 431-440, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-011-1653-4>
IF:1.214 (2010)

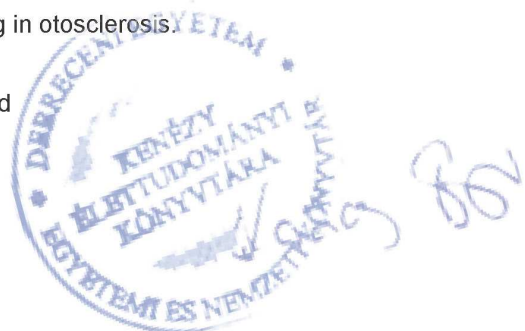
8. Toth, L., **Csomor, P.**, Sziklai, I., Karosi, T.: Biofilm detection in chronic rhinosinusitis by combined application of hematoxylin-eosin and gram staining.
Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryn. 268 (10), 1455-1462, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-011-1623-x>
IF:1.214 (2010)

9. **Csomor P.**, Szalmás A., Kónya J., Karosi T., Sziklai I.: Az otosclerosisra jellemző CD46 variánsok molekuláris biológiai jellemzése.
Fül-Orr-Gégégyógy. 56 (1), 221-230, 2010.

10. **Csomor P.**, Karosi T., Liktör B., Z. Szabó L., Pytel J., Jóri J., Sziklai I.: Otosclerosis: A sejt-túlélés és az apoptózis szabályozásának zavara.
Fül-Orr-Gégégyógy. 56 (2), 72-80, 2010.



11. Karosi, T., **Csomor, P.**, Szalmás, A., Kónya, J., Petkó, M., Sziklai, I.: Osteoprotegerin expression and sensitivity in otosclerosis with different histological activity.
Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryn. 268 (3), 357-365, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-010-1404-y>
IF:1.214
12. Karosi T., **Csomor P.**, Szekanecz Z., Sziklai I.: Az otosclerosis etiopathogenezise.
Fül-Orr-Gégégyógy. 56 (4), 218-233, 2010.
13. **Csomor P.**, Karosi T., Pytel J., Jóri J., Z. Szabó L., Liktör B., Sziklai I.: A TNF-alfa receptor expresszió összefügg az otosclerosis szövettani aktivitásával.
Fül-, Orr-, Gégégyógy. 55 (4), 176-184, 2009.
14. Karosi T., **Csomor P.**, Z. Szabó L., Liktör B., Petkó M., Pytel J., Jóri J., Sziklai I.: A nem otosclerosisos stapes fixációk kórszövettani osztályozása.
Fül-Orr-Gégégyógy. 55 (3), 110-120, 2009.
15. Karosi T., **Csomor P.**, Szalmás A., Kónya J., Z. Szabó L., Liktör B., Petkó M., Pytel J., Jóri J., Sziklai I.: Új, otosclerosis-specifikus CD46 variánsok: Az otosclerosisos csontátépülés genetikai alapja?
Fül-Orr-Gégégyógy. 55 (1), 17-27, 2009.
16. Karosi, T., **Csomor, P.**, Petkó, M., Liktör, B., Z. Szabó, L., Pytel, J., Jóri, J., Sziklai, I.:
Histopathology of Nonotosclerotic Stapes Fixations.
Otol. Neurotol. 30 (8), 1058-1066, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MAO.0b013e31819fe802>
IF:1.435
17. Karosi T., Tóth Á., **Csomor P.**, Sziklai I.: Differenciáldiagnosztikai nehézséget okozó, retrochoanális orrpoly: Esetismertetés.
Fül-Orr-Gégégyógy. 55 (4), 164-168, 2009.
18. Karosi, T., Szalmás, A., **Csomor, P.**, Kónya, J., Petkó, M., Sziklai, I.: Disease-associated novel CD46 splicing variants and pathologic bone remodeling in otosclerosis.
Laryngoscope. 118 (9), 1669-1676, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MLG.0b013e31817c133d>
IF:1.877



Összesített impakt faktor: 16.131

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 4.667

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.04.06



TÁRGYSZAVAK

alternatív splicing, apoptózis, CD46, gyógyszeres kezelés, gyulladás, kanyaróvírus, otosclerosis, stapes ankylosis, TNF- α

KEYWORDS

alternative splicing, apoptosis, CD46, inflammation, measles virus, otosclerosis, pharmaceutical treatment, stapes ankylosis, TNF- α

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Karosi Tamásnak, aki időt és fáradságot nem kímélve irányította a kutatásainkat mindig a megfelelő irányba. Nagyban hozzájárult a kutatói munkához szükséges kritikus és elemző szemléletmód elsajátításához, és számtalanszor segített eligazodnom a kutatás klinikai aspektusainak megértésében, ami biológusként nem egyszer nehézségeket okozott. Kritikus észrevételei és építő jellegű kritikái mindig hasznosnak bizonyultak.

Köszönettel tartozom Professzor Dr. Sziklai István, egyetemi tanárnak, aki lehetőséget biztosított nekem arra, hogy bekapcsolódjak az intézetében folyó tudományos kutatómunkába, és hasznos tanácsaival, észrevételeivel, támogatásával segítette munkánkat.

Köszönöm Dr. Kónya József intézetvezető egyetemi docensnek, hogy lehetőséget biztosított a két intézet közötti folytonos együttműködésre, és arra, hogy az Orvosi Mikrobiológiai Intézet laboratóriumainak eszközeit, vegyszereit, műszereit használhassam a molekuláris biológiai módszereket igénylő kísérleteink során.

Külön Köszönöm Szalmás Anitának a laboratóriumi munkában való odaadó és önzetlen segítségét, gyakorlatias szemléletével sokszor segített a kísérletes munka tervezése és optimalizálása során felmerülő problémák megoldásában.

Köszönettel tartozom még Dr. Csoma Eszternek, Mészáros Beátának, Oraveczné Gyöngyösi Eszternek, Antalné László Brigittának, Kissné Deák Adreának valamint az Orvosi Mikrobiológiai Intézet dolgozóinak a mindennapi laboratóriumi munkában nyújtott segítségért.

Köszönöm Dr. Liktör Bálintnak, Prof. Dr. Z. Szabó Lászlónak, Prof. Dr. Pytel Józsefnek, Prof. Dr. Jóri Józsefnek és munkatársaiknak a stapes minták összegyűjtésében nyújtott segítségüket.

Restriction analysis of otosclerosis-associated CD46 splicing variants

Péter Csomor · Anita Szalmás · József Kónya ·
István Sziklai · Tamás Karosi

Received: 29 March 2009 / Accepted: 30 June 2009 / Published online: 14 July 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Otosclerosis is a primary bone remodeling disorder of the human otic capsule and is associated with persistent measles virus infection. The human cellular receptor of measles virus is the membrane cofactor protein (MCP, CD46), which has 14 well-described splicing variants. Unique CD46 expression pattern of the otic capsule and the stapes footplate may determine the susceptibility for persistent measles virus infection. A total of 51 surgically removed ankylotic stapes footplates were analyzed by histopathological and molecular biological methods, respectively. Nucleic acids were extracted. Measles virus sequences were detected by nucleoprotein RNA-specific reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Alternatively spliced RNA of CD46 isoforms was amplified by RT-PCR; cDNA amplicons were separated by SDS poly-acrylamide gel electrophoresis and were purified from the gel. Complementary DNA of CD46 isoforms was restricted by endonuclease enzymes having CD46-specific recognition sites. The presence of viral RNA was associated exclusively with the histopathological diagnosis of otosclerosis; the stapes specimens with negative measles virus belonged to non-otosclerotic stapes fixations. All specimens ($N = 51$) were characterized by the consecutive expression of five CD46 variants (c, d, e, f and one shorter

unidentified isoform). Histologically confirmed otosclerotic specimens ($N = 21$) were characterized by increased expression levels of variant "f" and the unknown isoform. Increased expression levels of these isoforms and special CD46 expression pattern of the human otic capsule might produce modified or pathological intracellular signalization that could create the possibility of persistent measles virus infection.

Keywords CD46 · Otosclerosis · Measles virus · RT-PCR · Restriction analysis

Introduction

Otosclerosis is a primary hearing disorder, which is associated with increased bone remodeling of the human otic capsule [1]. Pathological bone remodeling is characterized by increased osteoclast activation and intensive osteolysis in the otosclerotic foci [2]. Lesions of otosclerosis are exclusively localized only in the bony parts of the otic capsule: footplate of the stapes, and pericochlear- and perilyabyrinthine regions [3]. The mechanical properties of the movements of the stapes footplate are modified, leading to consequent conductive hearing loss [1]. In the white population, the prevalence of clinical otosclerosis is 0.3–0.4% in the general population and 9–12% for those suffering from conductive hearing loss [1].

The main etiological factor of otosclerosis is the persistent measles virus infection of the otic capsule [4–9]. Theoretically, the continuous presence of antigens derived from measles virus stimulates the cellular immune response, eventually leading to inflammatory bone remodeling and consequent sensorineural hearing loss [1, 8, 10]. Earlier studies have supposed the potential role of measles virus

P. Csomor · I. Sziklai · T. Karosi (✉)
Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery,
University of Debrecen Medical and Health Science Center,
Nagyterdei krt. 98, Debrecen 4032, Hungary
e-mail: karositas@gmail.com

A. Szalmás · J. Kónya
Department of Medical Microbiology,
University of Debrecen Medical and Health Science Center,
Debrecen, Hungary

infection in the pathogenesis of otosclerosis [5, 8]. The presence of measles virus genome in otosclerotic stapes footplates was demonstrated by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) [4, 6]. Virus-like particles have been recognized in the osteoclasts and osteoblasts of otosclerotic foci by electron microscopy [9].

The measles virus, being a member of the Paramyxovirus family, penetrates into human cells in three different ways [11, 12]. The most effective infections are carried out via the SLAM (signalling lymphocyte activating protein, CD150) receptor; less effective infections are mediated via the CD46 receptor (membrane cofactor protein, MCP) [11, 12]. New modes of virus penetration have been described in the latest studies [11]. Measles infections and viral transmission of human cell lines without expression of any known measles virus receptors have been recently demonstrated [11]. These infections were described as having the lowest efficacy [11]. The undescribed measles virus receptor-like molecule has been named as Receptor X [11].

Immunohistochemical studies have shown very low expression levels of SLAM proteins on the cells of the human otic capsule, in contrast to the intensive expression of measles virus receptor CD46 [13, 14]. These observations have supposed that the cellular penetration of the measles virus is mainly associated with the expression of CD46 in the human otic capsule [13].

CD46 protein has 14 well-described variants, which are alternatively spliced from the transcribed mRNA of the CD46 gene [14]. The gene of CD46 is located on chromosome 1 and includes 14 exons, which determine the four different functional subunits of the protein [14, 15]. Exons 1–6 encode the conservative region of CD46 determining the complement control protein (CCP) and short consensus repeat (SCR) regions, which are responsible for the proteolytic inactivation of C3b and C4b complement components by the co-activation of serum factor I [15, 16]. The CCP region is also known as the receptor of measles virus [11, 12]. Exons 7–9 encode the serine threonin prolin-rich (STP) region, which is necessary for the anchoring of CD46 protein to the extracellular matrix [17]. Exons 10–12 encode the transmembrane region of CD46 [15–17]. Novel otosclerosis-associated CD46 variants have been described recently [18]. One of these variants has been characterized by the complete absence of the transmembrane region [18]. Exons 13–14 encode the cytoplasmic domain of CD46, which mediates the intracellular phosphorylase-dependent signalization [19]. CD46 isoforms have four different types of cytoplasmic domains with variable intracellular signalization: *CYT-1* (17 amino acids), and *CYT-2* (24 amino acids) are more frequent, while *CYT-3* and *CYT-4* are rare [19]. Measles virus infection of human immune cells via the CD46 receptor makes long-term changes in the expres-

sion of inflammatory cytokines (interleukin-1, -6, -12) that play an important role in the differentiation of T-helper 1 and T-helper 2 cells [20–24]. CD46 isoforms have been detected on the surface of all nucleated human cells in various expression levels and patterns [14]. However, specific functions have not been attributed to isoform co-expression yet [14, 17].

This study investigates the co-expression pattern of CD46 splicing variants in otosclerotic and non-otosclerotic stapes footplate specimens by restriction analysis in conjunction with measles virus-specific RT-PCR.

Materials and methods

Patients and controls

A total of 51 stapes footplates ($N=51$, male = 17, female = 34) were analyzed. All of them were ankylotic and were removed during stapedectomy. After the surgical removal, specimens were immediately fixed in 10% (w/v) formalin. Postoperative histopathological analysis was performed to make a differentiation between otosclerotic- and non-otosclerotic stapes fixations. The mean age of patients with non-otosclerotic stapes fixation was 35.47 ($N=30$; range = 19–57) years; in case of otosclerosis, it was 39.17 ($N=21$; range = 23–62) years. Clinical diagnosis of stapes fixation was based on otoscopic, audiometric and tympanometric findings. Air–bone gap at 1,000 Hz was at least 30 dB. Tympanometry revealed As-type tympanograms in most cases (>90%). None of the patients remembered measles virus infection in childhood; however, 17 patients (born after 1969) had documented anti-measles vaccination. Anti-measles IgG serum levels were measured by ELISA according to the manufacturer's instructions (Immuno Biological Laboratories, Germany). Anti-measles immunoglobulin level is considered to be positive above 12 IU/ml. The cutoff zone is between 8 and 12 IU/ml levels, and negative reaction (otosclerosis positivity) was established below the 8 IU/ml level. The non-otosclerotic stapes footplate specimens selected histologically were employed as negative controls for patients with otosclerotic stapes fixation. The Hungarian Scientific Research Ethical Committee (ETT-TUKEB/2008-113-547/89) approved this study.

Histopathological analysis

A total of 51 ankylotic stapes footplate specimens were fixed in 10% (v/w) buffered formalin and decalcified in 0.5 M sodium ethylene-diamino-tetraacetate (Na-EDTA, 72 h, 4°C). These specimens were embedded in 20% (v/w) purified gelatin (24 h, 56°C) and refixed in 4% paraformaldehyde (24 h, 20°C). Blocks were cryoprotected in 20%

saccharose solution (2 h, 4°C) and sectioned by cryomicrotome into 10 µm slides (−45°C). Slides were stored in 0.1 M phosphate buffered saline containing sodium azide at 4°C. Two consecutive 10 µm frozen cut sections were examined as follows: (1) nucleic acid extraction and RT-PCR amplification; (2) staining with hematoxylin and eosin. Imaging was performed under normal- and polarized light and the photographs were archived in jpeg file format (Axioskop2 MOT, Axiovision 3.0, Zeiss, Jena, Germany).

Nucleic acid extraction and RT-PCR detection of measles virus genome

Total RNA was extracted from homogenized tissue sections using TRI reagent (Sigma-Aldrich, USA) solution according to the manufacturer's instructions. Presence of measles virus genome was certified by semi-nested RT-PCR; the target sequence was located between the 1091 and 1531 (5'–3') nucleotides of the measles virus genome. Measles virus nucleoprotein (NP) RNA was amplified with an NP-specific primer combination: MV2-MV3 (Table 1). rTth enzyme (Recombinant *Thermus thermophilus*; Applied Biosystems, USA) was used during the RT step of the reaction. Complementary DNA was amplified by genomic Red-*Taq* (Sigma-Aldrich, USA) polymerase enzyme in the semi-nested PCR. Special primer combinations were used in this reaction: MV3 and MV4; MV2 and NP14 (Table 1). Suitability of RNA of the measles virus detection by RT-PCR was controlled comprehensively by engagement of the following housekeeping control primer combination: h36B4+ and h36B4− (Table 1). Enhanced avian reverse

transcriptase (EA-RT; Sigma-Aldrich, USA) and genomic Red-*Taq* DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, USA) enzymes were used in the cellular control RT-PCR. Live, attenuated Edmonston strain of measles virus was used as positive control. RNA-free samples were used to avoid cross-contamination [4].

RT-PCR detection of CD46 splicing variants

Extracted RNA of CD46 was amplified by two CD46-specific primers: CD46Kfor and CD46Krev (Table 1). Hypervariable region of the CD46 gene was amplified by enhanced avian myeloblastosis virus reverse transcriptase enzyme (eAMV-RT; Sigma-Aldrich, USA) during the RT-step of the reaction. The primer CD46Kfor has a specific annealing site on the border of exon 5 and exon 6; while the primer CD46Krev has its annealing site in the exon 14. The amplified complementary DNA sequence contained the whole hypervariable region of matured CD46 mRNA. JumpStart Accu *Taq* LA DNA polymerase enzyme (Sigma-Aldrich, USA) was used for the cDNA-PCR reaction with two semi-nested primer combination: CD46Bfor and CD46Brev (Table 1). DNA-free water was used as negative control. The following parameters were used for RT-PCR reactions. *RT-step*: Primers and samples were incubated together at 75°C for 10 min, the master mix was added to the compound and the mixture was incubated at 48°C for 20 min, and later at 50°C for 30 min. *cDNA-PCR*: Samples were denaturated at 94°C for 3 min. Annealation and extension was carried out at 60 and 68°C for 35 cycles, which was followed by 2 min incubation at 68°C. Results

Table 1 Main features of measles virus- and CD46-specific oligonucleotide primers

Primer	Sequence (5'–3')	Annealing temperature (°C)
Measles virus nucleoprotein-specific primers		
RT primers		
MV2 (−)	GTTCCTCCGAGATTCCTGCCA	62
MV3 (+)	GCATCTGAACCTCGGTATCAC	62
Seminested primers		
MV4 (−)	AGCTCTCGCATCTGCTCT	55
NP14 (+)	GCAAGGAAGATAGGAGGGTC	55
Human cellular control primers		
H36B4+ (+)	AGATGCAGCAGATCCGCAT	55
H36B4− (−)	ATATGAGGCAGGAGTTTCTCCAG	55
CD46-specific primers		
RT primers		
CD46Kfor (+)	GAGTGTAAAGTGGTCAAATGTCCG	75
CD46Krev (−)	GGAGTGGTTGATTTAGTCTGTGTAA	75
cDNA-PCR primers		
CD46Bfor (+)	TCGATGGCAGCGACACAA	60
CD46Brev (−)	GGTAAGTGGCATATTACGCTCCA	60

of CD46-specific RT-PCR were visualized with agarose gel electrophoresis. Determination of relative expression levels of different CD46 isoforms was carried out by densitometry [18].

Purification of CD46 amplimers from polyacrylamide gel

cDNA-PCR amplimers were separated by non-denaturing SDS poly-acrylamide gel electrophoresis. The gels were stained with ethidium bromide. Several variants of CD46 have very similar molecular weights, and thus on the grounds of their molecular weights could not be identified. UV-identified stripes representing different CD46 splicing variants were cut out from the poly-acrylamide gel with a scalpel. The gel blocks were placed in Eppendorf microtubes (1.5 ml), and 300 µl elution buffer (0.5 M ammonium-acetate, 1 mM EDTA) was added to the compound, which was incubated overnight at 37°C. The supernatant and gel fragments were separated by centrifugation. DNA

was precipitated twice with twofold volume of 100% (v/v) ethanol (−70°C, 10 min); DNA pellet was rinsed with 70% (v/v) ethanol, then dried and resuspended in 20 µl TE buffer.

Restriction analysis of the separated CD46 splicing variants

Separated CD46 splicing isoforms were identified with restriction analysis. Restriction enzymes having only one recognition site in the hypervariable region of the CD46 gene were selected. The following enzymes were found to be suitable for restriction analysis: (1) *HinfI* (exon 7); (2) *AccI* (exon 8); (3) *StuI* (exon 9); (4) *HpyCH4V* (exon 12); (5) *BsaI* (exon 13) (Fig. 1; Table 2). All cDNA specimens were digested by the restriction mix of the five aforementioned enzymes, respectively (48°C, 24 h). The result of the restriction analysis was visualized by agarose gel electrophoresis of the restricted cDNA amplimers.

Fig. 1 Sequence and restriction endonuclease recognition sites of the hypervariable region of CD46 messenger RNA (mRNA). Underlined sequence items represent the annealing sites of CD46-specific RT-primers (CD46Kfor and CD46Krev). Curved red arrows represent the initial points of mRNA exons. Colored quadrangles mark the specific recognition sites of restriction endonuclease enzymes. *HinfI*, *AccI*, *StuI*, *HpyCH4V*, *BsaI* are endonucleases with specific restriction sites for the hypervariable region of CD46 mRNA

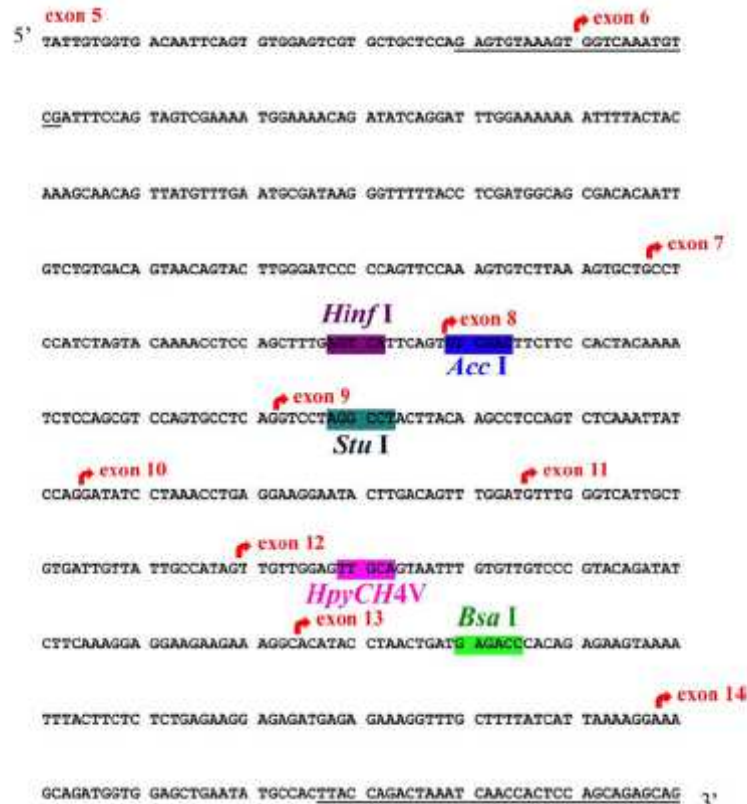


Table 2 Endonucleases with specific restriction sites for the hyper-variable region of different CD46 splicing variants

CD46 isoforms	Product size by nested RT-PCR (bp)	Restrictive enzymes
n	227	<i>StuI</i>
i	249	<i>HpyCH4V</i>
f	291	<i>StuI</i> , <i>HpyCH4V</i>
j	294	<i>AccI</i> , <i>HpyCH4V</i>
m	299	<i>AccI</i> , <i>StuI</i> , <i>HpyCH4V</i>
d	336	<i>AccI</i> , <i>StuI</i> , <i>HpyCH4V</i>
h	336	<i>HindIII</i> , <i>AccI</i> , <i>HpyCH4V</i>
k	342	<i>HpyCH4V</i> , <i>BsaI</i>
b	378	<i>HindIII</i> , <i>AccI</i> , <i>StuI</i> , <i>HpyCH4V</i>
e	384	<i>StuI</i> , <i>HpyCH4V</i> , <i>BsaI</i>
i	387	<i>AccI</i> , <i>HpyCH4V</i> , <i>BsaI</i>
c	429	<i>AccI</i> , <i>StuI</i> , <i>HpyCH4V</i> , <i>BsaI</i>
g	429	<i>HindIII</i> , <i>AccI</i> , <i>HpyCH4V</i> , <i>BsaI</i>
u	471	<i>HindIII</i> , <i>AccI</i> , <i>StuI</i> , <i>HpyCH4V</i> , <i>BsaI</i>

Results

Consecutive stapes footplate sections were subjected to histological examination and nucleic acid extraction, respectively. Histological diagnosis of otosclerosis was established in 21 ankylosed stapes footplates (Fig. 2). Among these patients, the otosclerotic foci were seen to be active in 16 stapes footplates and inactive in 5 cases (Fig. 2). Partial removed stapes footplates were not included in the study, because the anterior or posterior poles containing the bone lesions fixing the stapes were retained in the oval window niche. In the 30 non-otosclerotic stapes footplates, histologic examinations revealed stapediovestibular calcification with eosinophilic extracellular matrix, decreased cellularity and hypovascularization (Fig. 2).

Human ribosomal RNA was detected by cellular control RT-PCR in each of the 51 ankylosed stapes footplates (Fig. 2). All samples were eligible for testing the presence of RNA of the measles virus and for restriction analysis of the splicing variants of CD46 mRNA. It was shown that

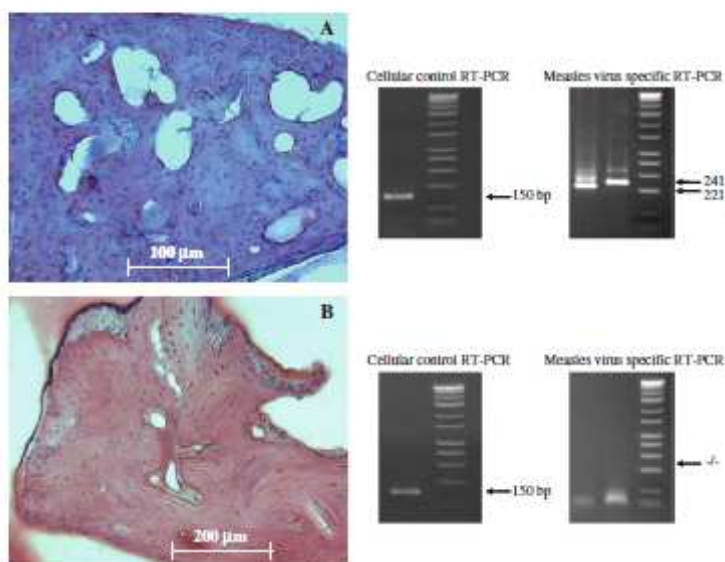


Fig. 2 RT-PCR amplification of measles virus nucleoprotein (NP) RNA and housekeeping control RT-PCR correlated to histological findings in otosclerotic and non-otosclerotic stapes footplates (hematoxylin–eosin). **a** Otosclerotic focus with increased activity at the anterior pole of the stapes footplate. Focus of otosclerosis is characterized by hypercellularity, wide pseudovascular spaces and marked basophilia. Cellular control RT-PCR was positive. Measles virus NP RNA

could be detected by application of both semi-nested primer pairs (MV3-MV4, MV2-NP14). **b** Ankylosed stapediovestibular calcification with decreased cellularity and vascularization. The pathologically remodeled osteoid substance shows marked eosinophilia. Human ribosomal RNA was detectable; however, measles virus-specific RT-PCR gave negative result

histological lesions represented strong correlation with measles virus RNA-specific RT-PCR results. Viral NP coding RNA was detectable only in histologically otosclerotic stapes footplates ($N = 21$; Fig. 2). Virus negative stapes footplates ($N = 30$) represented non-otosclerotic, degenerative disorders demonstrating theoretically different etiopathogenesis from otosclerosis (Fig. 2). Otosclerosis was featured by resorptive bone lesions consistent with vascular and pseudovascular elements containing increased numbers of osteoclasts, osteoblasts, fibroblasts and proliferating endothelial cells (Fig. 2). Non-otosclerotic stapes fixations were represented by annular calcification ($N = 19$), globular fibrosis ($N = 7$) and lymphocytic infiltration ($N = 4$) (Fig. 2).

The serum levels of anti-measles IgG showed a statistically significant difference between otosclerosis and non-otosclerotic stapes ankylosis. Anti-measles IgG levels were significantly lower in the sera of patients with otosclerosis (median = 6.9 IU/ml) in contrast to the virus negative, non-otosclerotic stapes fixations (median = 142 IU/ml). Seventeen patients had documented anti-measles vaccination in childhood. Interestingly, 11 of them suffered from histologically confirmed measles virus-positive otosclerotic stapes fixation with negative anti-measles IgG titer in the serum (median = 6.1 IU/ml). The other six patients represented histologically non-otosclerotic stapes fixation with seropositivity against measles virus (IgG median = 133 IU/ml).

Otosclerotic and non-otosclerotic stapes footplates were characterized by the consistent co-expression of the same five CD46 isoforms showing variable expression levels (Fig. 3). These isoforms were identified by restriction analysis and molecular weight distribution (Fig. 4). It was shown that variants "c", "d", "e", "f" and an unknown shorter CD46 splicing variant were detectable in all specimens (Figs. 3, 4). The alternatively spliced mRNA of the unidentified isoform represented a short hypervariable region containing exon 9 (Fig. 4). The restriction pattern of the unknown isoform was the same as that of the variant "n"; however, the molecular weights were absolutely different (Fig. 4; Table 2). The relative expression levels of the five isoforms were determined by densitometry. In contrast to non-otosclerotic stapes fixation, isoform "f" and the unknown isoform showed significantly increased expression levels in the otosclerotic specimens (Fig. 3). In conclusion, otosclerosis was characterized by the unique expression pattern of CD46 variants in the following order of decreasing expression levels: f (4.), d (3.), e (2.), c (1.) and the unknown (5.) variant (Fig. 3). Non-otosclerotic stapes fixation was featured by the decreasing expression levels of d (3.), f (4.), c (1.), e (2.) and unknown (5.) splicing isoforms (Fig. 3). It should be emphasized that the unknown (5.) variant represented a negligible expression level in case of non-otosclerotic stapes fixation (Fig. 3).

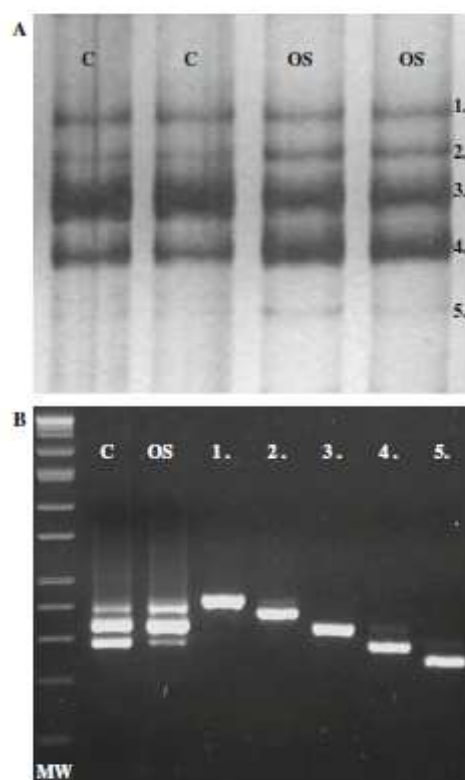
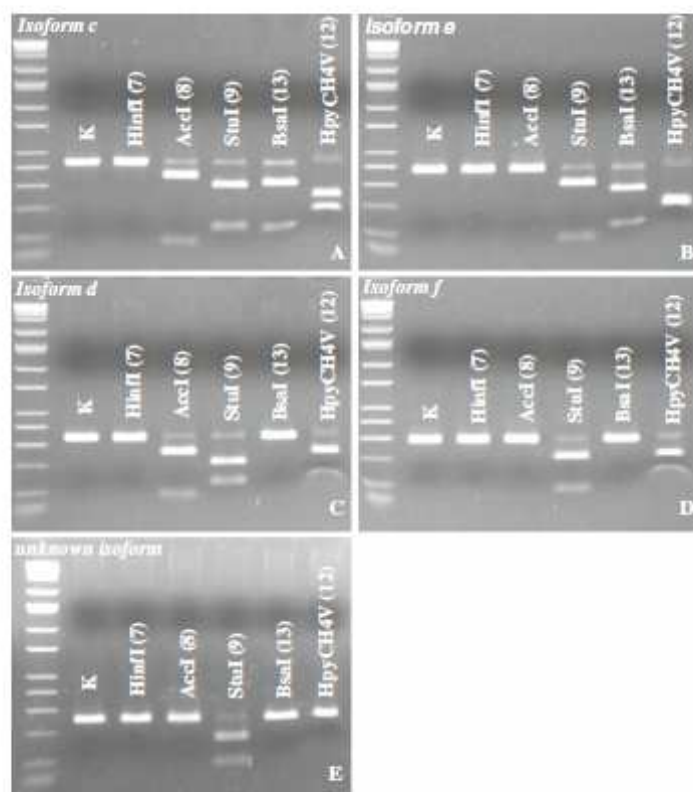


Fig. 3 Complementary DNA of CD46 splicing isoforms separated by SDS poly-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). **a** CD46 expression pattern of otosclerotic and non-otosclerotic stapes footplate specimens (inverted SDS-PAGE photograph under UV light exposition). The same five CD46 isoforms with different expression levels were detected in otosclerotic and also in non-otosclerotic samples. Isoform co-expression pattern was associated with was strongly associated with histological findings. *Numbers* mark the isoform amplimers of CD46 mRNA-specific RT-PCR. *c* negative control, non-otosclerotic stapes footplate. *OS* otosclerotic stapes footplate. **b** Purified and separated CD46 cDNAs (agarose gel photograph under UV light exposition). *Numbers* mark the purified and re-separated isoform amplimers of CD46 mRNA-specific RT-PCR. *c* negative control, non-otosclerotic sample. *OS* otosclerotic sample, *MW* molecule weight marker. *1* variant c, *2* variant e, *3* variant d, *4* variant f, *5* the unknown variant

Discussion

Our results confirmed the presence of RNA of the measles virus in the histologically diagnosed otosclerotic stapes footplate specimens. This feature was absolutely independent from the histologic grade of otosclerotic bone remodeling. The failure to detect RNA of the measles virus in the

Fig. 4 Restriction analysis of CD46 cDNA amplimers. The five separated CD46 splicing variants were analyzed comprehensively by employment of a molecular weight marker. Four of them were identified as follows: isoforms “c”, “e”, “d” and “f”. One of them was an unknown splicing variant and remained unidentified; it was characterized by the same restriction pattern as that of variant “n”, however, the molecular weights were absolutely different. *HinfI*, *AclI*, *SstI*, *HpyCH4V* and *BsaI* are restriction endonucleases with specific restriction site for the hypervariable region of CD46. Numbers in brackets following the names of endonucleases represent the exon of the hypervariable region containing the cleavage site of the enzyme. **a** Restriction pattern of isoform “c”. **b** Restriction pattern of isoform “e”. **c** Restriction pattern of isoform “d”. **d** Restriction pattern of isoform “f”. **e** Restriction pattern of the unknown CD46 isoform. *K* unrestricted, control amplimer, *MW* molecule weight marker



stapes footplates was associated with histologically non-otosclerotic stapes fixation. Ankylosed stapes footplates with negative measles virus belong to degenerative disorders with non-otosclerotic histopathology.

Chronic and persistent measles virus replication in the human otic capsule has been identified as one of the main etiological factors of the pathogenesis of otosclerosis [4, 5]. The continuous presence of antigens derived from the measles virus might result in a permanent stimulation of the cellular immune response, leading to a constant inflammatory reaction and cellular damage in the concerned bone tissue; however, defective measles virus is unable to directly destroy the tissue [4, 5, 7, 8]. Immune stimuli mediated by antigen-activated CD3 and CD46 molecules are essential factors in differentiation and activation of regulator T-helper 1 cells [23, 24]. These regulator cells play an important role in the elimination of autoreactive cytotoxic, CD8+ T cells [25]. Inactivation or insufficient differentiation of this regulator T cell population may decrease or deactivate the natural self-tolerance, leading to the appearance of different

autoimmune diseases [25]. The unknown shorter CD46 splicing variant is presumably one of the newly described otosclerosis-associated isoforms [18]. The presence of these otosclerosis-specific CD46 variants on the cells of the human otic capsule probably decreases the measles-activated CD3 and CD46 co-stimulation in the differentiation of regulator T-helper 1 cells [24, 25]. These events are supposed to lead to the development of an autoimmune reaction against the otic capsule, which might result in consequent sensorineural hearing loss [10, 26, 27].

Restriction analysis of CD46 splicing variants provided interesting information about the CD46 isoform co-expression pattern of otosclerotic- and non-otosclerotic stapes footplates. The consistent co-expression pattern of the same five CD46 isoforms, with various and histology-specific expression levels characterized otosclerotic- and non-otosclerotic specimens, respectively. Variants “c”, “d”, “e”, “f” and one more unknown shorter isoform were detected in each specimen. Unlike non-otosclerotic stapes fixation, relatively increased expression levels of variant “f” and the

unidentified variant characterized otosclerosis. Exon 13 was missing from the mRNA of variant “F” due to alternative splicing. This exon encodes the main part of the cytoplasmic domain of the CD46 receptor [19]. This domain is responsible for the intracellular phosphorylate-mediated signalization after receptor activation [19]. Lack of exon 13 may produce modified or pathological intracellular signalization. Changes of intracellular signal transduction may determine the susceptibility for persistent measles virus infection. These experiments may provide the basis of the organotropism of otosclerosis and the exclusive Paramyxovirus favoring characteristics of the human otic capsule [18].

Our experiments suggest that the otic capsule has unique CD46 expression pattern in otosclerotic and non-otosclerotic stapes fixations. The special expression pattern probably creates the possibility of the development of persistent measles virus infection in the susceptible stapes footplates.

Acknowledgments This work was supported by the grants from the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA PD75371) and Mecénatúra Fund of Debrecen University (DE OEC MEC/17/2008).

References

- Sidding MA (2006) Otosclerosis: a review of aetiology, management and outcomes. *Br J Hosp Med* 67:470–472–476
- Linthicum FH Jr (1993) Histopathology of otosclerosis. *Otolaryngol Clin North Am* 26:335–352
- Wang PC, Merchant SN, McKenna MJ, Glynn RJ, Nadol JB Jr (1999) Does otosclerosis occur only in the temporal bone? *Am J Otol* 20:162–165
- Kurusi T, Kónya J, Szabó LZ, Sziklai I (2004) Measles virus prevalence in otosclerotic stapes footplate samples. *Otol Neurotol* 25:451–456
- Arnold W, Friedmann I (1988) Otosclerosis: an inflammatory disease of the otic capsule of viral aetiology? *J Laryngol Otol* 102:865–871
- Niedermeyer HP, Arnold W, Schuster M, Baumann C, Kramer J, Neubert WJ, Sedlmeier R (2001) Persistent measles virus infection and otosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110:897–903
- Arnold W, Niedermeyer HP, Lehn N, Neubert W, Höfler H (1996) Measles virus in otosclerosis and the specific immune response of the inner ear. *Acta Otolaryngol* 116:705–709
- Niedermeyer HP, Arnold W (1995) Otosclerosis: a measles virus associated inflammatory disease. *Acta Otolaryngol* 115:300–303
- McKenna MJ, Mills BG (1990) Ultrastructural and immunohistochemical evidence of measles virus in active otosclerosis. *Acta Otolaryngol* 470:130–140
- Sziklai I (1996) Human otosclerotic bone-derived peptide decreases the gain of the electromotility in isolated outer hair cells. *Hear Res* 95:100–107
- Yanagi Y, Takeda M, Ohno S, Seki F (2006) Measles virus receptors and tropism. *Jpn J Infect Dis* 59:1–5
- Cattaneo Robert (2004) Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogen's magnet. *J Virol* 78:4385–4388
- Karosi T, Jókay I, Kónya J, Petkó M, Szabó LZ, Sziklai I (2007) Expression of measles virus receptors in otosclerotic, non-otosclerotic and in normal stapes footplates. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 264:607–613
- Russel SM, Sparrow RL, McKenzie IF, Purcell DF (1996) Tissue-specific and allelic expression of the complement regulator CD46 is controlled by alternative splicing. *Eur J Immunol* 6:1513–1518
- Riley-Vargas RC, Gill DB, Kemper C, Liszewski MK, Atkinson JP (2004) CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol* 25:496–503
- Barilla-Labarca ML, Liszewski MK, Lambris JD, Hourcade D, Atkinson JP (2002) Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells. *J Immunol* 168:6298–6304
- Seya T, Hirano A, Matsumoto M, Nomura M, Ueda S (1999) Human membrane cofactor protein (MCP, CD46): multiple isoforms and functions. *Int J Biochem Cell Biol* 31:1255–1260
- Karosi T, Szalmás A, Csomor P, Kónya J, Petkó M, Sziklai I (2008) Disease associated CD46 splicing variants and pathologic bone remodelling in otosclerosis. *Laryngoscope* 118:1669–1676
- Marie JC, Astier AL, Rivallier P, Rabourdin-Combe C, Wild TF, Horvat B (2002) Linking innate and acquired immunity: divergent role of CD46 cytoplasmic domains in T cell-induced inflammation. *Nat Immunol* 3:659–666
- Permar SR, Griffin DE, Levitt NL (2006) Immune containment and consequences of measles virus infection in healthy and immunocompromised individuals. *Clin Vaccine Immunol* 13:437–443
- Griffin DE, Ward BJ, Jauregui E, Johnson RT, Vaisberg A (1992) Immune activation during measles: beta 2-microglobulin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated disease. *J Infect Dis* 166:1170–1173
- Griffin DE, Ward BJ, Jauregui E, Johnson RT, Vaisberg A (1989) Immune activation in measles. *N Engl J Med* 320:1667–1672
- Schneider-Schaulies S, Niewiesk S, Schneider-Schaulies J, ter Meulen V (2001) Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms. *Curr Mol Med* 1:163–181
- Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP (2003) Activation of human CD4⁺ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 421:388–392
- Sakaguchi S (2000) Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101:455–458
- Helfgott SM, Moscicki RA, San Martín J, Lorenzo C, Kieval R, McKenna M, Nadol J, Trentham DE (1991) Correlation between antibodies to type II collagen and treatment outcome in bilateral progressive sensorineural hearing loss. *Lancet* 337:387–389
- Karosi T, Szekanez Z, Sziklai I (2009) Otosclerosis: an autoimmune disease? *Autoimmun Rev* [Epub ahead of print]

TNF- α Receptor Expression Correlates With Histologic Activity of Otosclerosis

Péter Csomor, István Sziklai, and Tamás Karosi

Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Medical and Health Science Center,
University of Debrecen, Debrecen, Hungary

Hypothesis: Otosclerosis is an inflammatory bone remodeling disorder of the human otic capsule, which might be characterized by variable levels and unique expression pattern of TNF- α receptors.

Background: Histologic characteristics of otosclerosis have been well described during the latest decades; however, the grading of different histopathologic and clinical stages has not been attributed precisely to the molecular biology of the pathologically increased metabolism of osteoclast-osteoblast axis.

Methods: Forty otosclerotic and 40 nonotosclerotic ankylosed stapes footplates ($n = 80$; men, 29; women, 51) were histologically analyzed: conventional hematoxylin-eosin staining and tumor necrosis factor- α receptor I and II (TNFRI/II)-specific immunofluorescent assay was performed.

Results: Active otosclerosis (Grades I-II; $n = 24$) was featured by increased expression of TNFRII and moderate expression of

TNFI; inactive cases (Grades III-IV) were characterized by permanent expression of TNFI; however, TNFRII-specific immunoreaction was absent. Nonotosclerotic stapes specimens showed a negligible TNFR expression. Tumor necrosis factor receptor expression pattern showed a strong correlation with the histologic activity of otosclerosis (χ^2 test; $p < 0.001$).

Conclusion: Detection of elevated TNFR expression demonstrates activated osteoclast metabolism and inflammatory pathways in otosclerosis. Different etiopathogenesis of otosclerotic and nonotosclerotic stapes ankylosis should be distinguished. Administration of monoclonal anti-TNF- α antibody may be a reasonable option in the medical treatment of active stages of otosclerosis. **Key Words:** Inflammation—Nonotosclerotic stapes fixation—Otosclerosis—Tumor necrosis factor- α —Tumor necrosis factor- α receptors.

Otol Neurotol 00:00-00, 2009.

Otosclerosis is an inflammatory bone remodeling disorder of the human otic capsule that leads to progressive conductive and/or sensorineural hearing loss as a consequence of stapes footplate fixation and cochlear bone resorption with endosteal involvement (1). The otosclerotic histologic changes within the human otic capsule have been extensively studied since the turn of the 19th century; however, the pathogenesis of otosclerosis has not been fully elucidated (1,2). Characteristic otosclerotic foci appear only within the bony parts of the otic capsule (2,3). The histopathologic features of otosclerosis include focal, osteolytic bone lesions with high cellularity and vascularization in the pericochlear (35%) and perilaby-

inthine (15%) regions adjacent to the oval (90%) and round window (40%), as well as in the stapes footplate (95%) (2,3). Crura of the stapes are usually not involved because their embryonic origin is different from that of the stapes footplate (1,2,4). There are numerous misshapen osteoclasts, multinuclear giant cells, fibroblasts and proliferating endothelial cells within the active otosclerotic foci (2-4). It is possible to grade the histopathologic activity of otosclerosis on the basis of cellularity, vascularization, and the mass of intercellular collagen matrix (3).

Grade I otosclerosis is featured by thickened and distorted stapes footplate with irregular, woven pattern of cement lines. The focus of otosclerosis is basophilic, hypervascularized, and filled with numerous multinucleated osteoclasts, hypercellular fibrous stroma, and plump, distorted osteoblasts (3). The otosclerotic lesion shows the "Swiss cheese" pattern due to the wide pseudovascular spaces, which are Howship-type osteolytic lacunae (3). Grade II otosclerosis is quite similar, except that typical osteoclast-like, multinuclear cells are missing. The mosaic structure of cement lines and the marked basophilia are retained (3). Grade III otosclerosis is represented by predominantly eosinophilic, woven bone containing some

Address correspondence and reprint requests to Tamás Karosi, M.D., Ph.D., Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Nagyerdei Krt. 98, Debrecen H-4032, Hungary; E-mail: karositamas@gmail.com; Web: www.eapathology.eu

This work was supported by Grant OTKA PD75371 from the Hungarian Scientific Research Fund and Grant DE OEC Mec 17/2008 from the Mecénatúra Fund of Debrecen University.

lamellar structure. Osteoclasts and osteoblasts are vanished; vascular spaces are eventually obliterated (3). End-stage or Grade IV otosclerosis means a remodeled lamellar bone structure with hypocellularity and avascularization. The compact bone shows intense eosinophilic staining. In some cases, there may be representation of all 4 stages, and the wide pseudovascular spaces seem to be acellular (3). A question arises: are the histologic stages of otosclerosis existing categories of the same bone remodeling disorder or are they independent representations of different processes?

Apart from the histopathologic detection of measles virus and osteoclasts containing viral sequences previously described, more evidence has arisen, suggesting the role of sustained viral infection in the pathogenesis of otosclerosis (5–7). Paramyxovirus infection has been implicated in other bone disorders such as Paget disease (1,5–7). Numerous studies have been initiated to determine the etiologic role of measles virus infection in otosclerosis (5–7).

In early stages of otosclerosis, tumor necrosis factor (TNF)- α is suspected to be released from the foci (8–10). Tumor necrosis factor- α could flow into the perilymph and can interfere with the electromotility of outer hair cells, resulting in sensorineural hearing loss (SNHL) (8,9). Because TNF- α is produced in the otosclerotic bone, the putative source of SNHL in otosclerosis might be the TNF- α release. Increased expression of TNF- α has been demonstrated in active otosclerosis, which may lead to extensive osteoclast activation and bone resorption (8,9). Tumor necrosis factor- α is a proinflammatory cytokine that plays a role in the osteolytic process and in the differentiation of bone marrow-derived mononuclear cells osteocytes to osteoclasts or stromal cells to osteoblasts (8–10). Tumor necrosis factor- α is produced by activated monocytes, macrophages, B cells, T cells, and osteoclasts, and it is an important paracrine mediator of the intercellular communication between osteoclasts and osteoblasts (8–10). Decreased expression of osteoprotegerin (OPG), also called TNFRSF11b (TNF- α Super Family Member 11b) has also been reported in active otosclerosis (8). Osteoprotegerin blocks the osteoclast formation and osteolysis and induces the apoptosis of activated osteoclasts (8). The main function of OPG is to regulate normal bone turnover with balanced osteoclast and osteoblast functions (8,10). Osteoprotegerin acts as a decoy receptor; it blocks the interaction of RANK (receptor activator of nuclear factor κ B) with its ligand RANKL and thus inhibits osteoclast development and activation (8,10).

Tumor necrosis factor- α has 2 main types of receptors (11,12). Type I TNF- α receptor (TNFR1, member of TNF superfamily I) is generally expressed by all nucleated human cells and has greater broader spectrum of biologic influence effectiveness than TNFR2 (11). Type II TNF- α receptor (TNFR2, member of TNF superfamily II) is expressed by lymphocytes and antigen presenting cells and also by the osteoclasts and resting embryonic cells (12,13). Increased expression of TNFR2 is a potent indicator of acute inflammatory reaction because it plays an important role in the recruitment of immune cells, activa-

tion of osteoclasts, and production of inflammatory cytokines (interleukin [IL] 1, IL-6, transforming growth factor- β) (13). After binding of TNF- α , Type I TNF- α receptors form a homotrimer structure activating the silencer of death domains, which binds the TNFR-associated death domain, allowing 3 different ways of signal transduction (14,15). The first and most important way is the activation of nuclear factor- κ B (nuclear factor- κ -light-chain-enhancer of activated B cells) system (14,15). Activated heterodimers of nuclear factor- κ B being nuclear transcription factors stimulate the transcription of several antiapoptotic and other genes coding inflammatory proteins providing cell survival and proliferation (14,15). The second way is the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) system (14,15). This signaling process, which is associated with the activation and phosphorylation of several nuclear transcription factors (c-Jun N-terminal kinases, p38-MAPK, extracellular signal-regulated kinases), c-Jun N-terminal kinases, p38-MAPK, and extracellular signal-regulated kinases transcription factors, which stimulate the expression of c-Fos, c-Jun, c-Myc, and activating transcription factor 2 proteins, leading to intense cell proliferation and survival (14,15). The third way of TNFR1-associated signalization is the death domain-mediated and caspase-associated induction of apoptosis (16,17). Tumor necrosis factor receptor-associated death domains of TNFR1 bind the Fas-associating death domain containing protein, which recruit the cysteine protein caspase 8 complexes (16,17). After reaching the critical concentration, cysteine protein caspase 8 is activated by autoproteolysis, and the arising caspase 8 stimulates the effector caspases, leading to apoptotic cell death (16,17).

This study investigates the TNFR expression pattern in the lesion-forming cells of otosclerotic stapes footplates correlated to the histopathologic activity of otosclerosis with the aim of evaluating the molecular background of the transition between different stages of otosclerosis.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Controls

Eighty ankylosed stapes footplates ($n = 80$; men, 29; women, 51) removed during stapedectomy from 80 ears were analyzed. After surgical removal, stapes specimens were immediately fixed in formalin formaldehyde. The mean age of patients was 39.41 years (range, 17–71 yr). Stapes footplate specimens were sorted histologically from a larger pool ($n = 384$) of ankylosed stapes samples with the aim to obtain 40 otosclerotic and 40 nonotosclerotic stapes footplates. The diagnosis of stapes ankylosis was based on clinical, audiometric, and tympanometric findings. Air-bone gap at 1,000 Hz was at least 30 dB. Stapes fixation was clinically bilateral in approximately two thirds of patients; however, only 1 stapes obtained from each patient was analyzed because in this period, only unilateral stapedectomies have been performed in most cases. Stapes footplates were collected from December 2008 to February 2009 (Medical Universities of Debrecen, Pécs, Szeged and ENT Department of Bajcsy-Zsilinszky Hospital, Budapest; Hungary). The Hungarian Scientific Research Ethical Committee (ETT-TUEB/2008-113-547/89) approved this study.

TABLE 1. Expression of TNFRs in ankylotic stapes footplates with different histopathologies

Histopathology (H.E.) (n = 80)	TNFR ^I	TNFR ^{II}
Otosclerotic stapes fixation (n = 40)		
Active otosclerosis, Grades I–II (n = 24)	++ (+)	+++
Inactive otosclerosis, Grades III–IV (n = 16)	+	–
Nonotosclerotic stapes fixation (n = 40)		
Annular calcification (n = 27)	–	–
Globular fibrosis (n = 13)	–	–
Hyaline cartilage layer of the vestibular surface of the stapes footplate (n = 80)	++	++

*TNFR (Types I and II) immunoreaction; –, negative; +, weak perivascular reaction; ++, strong annular reaction; +++, robust granular, almost confluent reaction.

Histology and TNFR-Specific Immunohistology

A total of 80 ankylotic stapes specimens were fixed in 10% (w/v) buffered formaldehyde and decalcified in 0.5 M Na-EDTA (72 h; 4°C). Specimens were embedded in 15% (w/v) purified gelatin (24 h; 56°C) and refixed in 4% (w/v) paraformaldehyde (24 h; 20°C). Blocks were cryoprotected in 20% (w/v) saccharose solution (2 h; 4°C) and sectioned by a cryomicrotome into 10-μm slides (–40°C; MNT cryomicrotome, Slee, Germany). Slides were stored in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing sodium azide at 4°C. Two consecutive 10-μm frozen cut sections were examined as follows: 1) staining with hematoxylin and eosin and 2) TNFTNFR^I–II-specific immunofluorescent assays. The second ones of sections were washed (20 min; 20°C) in 0.2 M PBS containing Protein Block solution (1% [w/v], bovine serum albumin, 0.09% [w/v], sodium azide, 0.1% [w/v], Tween-20; BioGenex Laboratories Inc, San Ramon,

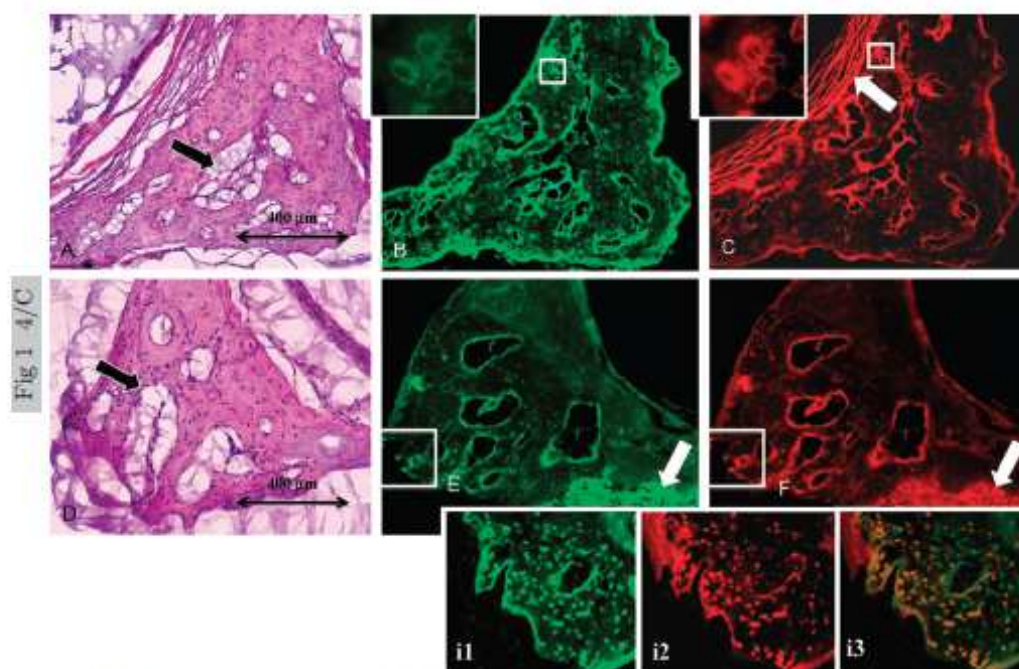


FIG. 1. Immunohistologic representation of TNFR expression in active otosclerosis. *A*, Active (Grade I) otosclerotic focus in the anterior pole of the stapes footplate (H.E.). Hypercellularity and wide pseudovascular spaces divided by several pseudoseptums (black arrow) can be identified. Nuclei of osteoclasts are pale and distended, indicating increased chromatin activity. *B*, Demonstration of TNFR expression in the previous section. Osteoclasts show strong granular TNFR-specific immunoreaction. The inserted picture presents the larger magnification view of TNFR expressing osteoclasts. *C*, Tumor necrosis factor- α receptor II-specific immunoreaction shows intense granular expression on the lesion-forming cells. The thickened middle ear mucosa shows increased expression of TNFR (white arrow). The inserted picture presents the larger magnification view of TNFR expressing osteoclasts. *D*, Otosclerotic focus with moderate activity (Grade II) in the posterior pole of the stapes footplate (H.E.). Pseudovascular spaces are indicated by black arrow. The osteoid substance is still hypercellular; however, the cement line shows irregular woven and concentric pattern. *E*, Immunohistologic representation of TNFR expression in the previous section. The lesion-forming cells show strong annular immunoreaction. The hyaline cartilage layer of the vestibular surface shows a considerable TNFR expression (white arrow). *F*, Tumor necrosis factor- α receptor II expression shows a quite similar pattern. The hyaline cartilage layer of the vestibular surface presents strong TNFR-specific immunoreaction (white arrow). *i1*, Large magnification view of osteoclasts expressing TNFR. *i2*, Large magnification view of osteoclasts showing TNFR expression. *i3*, Merged image of the previous inserts. Osteoclasts of the otosclerotic focus are characterized by expression of both TNFRs (orange); however, in the perivascular area, only TNFR immunoreaction can be identified (green).

CA, U.S.A.). Blocked sections were incubated with 0.005 mg/ml polyclonal goat anti-human TNF RI/TNFRSF1A antibody solution (100 μ l; 20°C; 24 h; continuous shaking; R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.). The first primary antibody was washed with 0.2 M PBS. Sections were incubated with 0.02 mg/ml monoclonal mouse hybridoma anti-human TNF RI/TNFRSF1B antibody solution (100 μ l; 20°C; 24 h; continuous shaking; R&D Systems). The second primary antibody was washed with 0.2 M PBS. Sections were incubated with 0.005 mg/ml Northern Lights donkey anti-goat immunoglobulin G labeled by NL-493 fluorochrome (50 μ l; 20°C; 12 h; continuous shaking; R&D Systems). The first secondary antibody was washed with 0.2 M PBS. Sections were incubated with the second secondary antibody: 0.005 mg/ml Northern Lights donkey anti-mouse immunoglobulin G labeled by NL-637 fluorochrome (50 μ l; 20°C; 12 h; continuous shaking; R&D Systems). All antibody incubations were performed in a sterile humid chamber. Slides were covered by UV transparent mounting medium (PromoFluor Antifade Reagent; Promocell, Heidelberg, Germany). Imaging was performed under UV light with 510-nm wavelengths for NL-493 and 650 nm for NL-637 fluorochrome with 96- to 123-millisecond exposure time. Photographs were archived in JPEG file format (Axioskop2 MOT, Axiovision 4.0, Zeiss, Oberkochen, Germany).

RESULTS

Consecutive sections were subjected to hematoxylin-eosin staining and TNFRI- and TNFRII-specific immo-

nofluorescent assays. Histologic diagnosis of otosclerosis was established in 40 ankylotic stapes footplates. Among these patients, the otosclerotic foci were seen to be active (Grades I and II) in 24 stapes footplates and inactive (Grades III and IV) in 16 cases (Table 1; Figs. 1 and 2). Partially removed stapes footplates were not included in the study because the anterior or posterior poles containing the bone lesions fixing the stapes were retained in the oval window niche. In the 40 nonotosclerotic stapes footplates, histologic examinations revealed annular calcification with eosinophilic extracellular matrix, decreased cellularity, and hypovascularization ($n = 27$), and globular fibrosis with monopolar or bipolar bone resorption at the anterior or posterior pole of the stapes footplate ($n = 13$; Table 1; Fig. 3).

Chondrocytes of the hyaline cartilage layer of the vestibular surface of each stapes footplate showed considerable positivity on TNFRI/II antigen receptor complex (Table 1; Figs. 1-3). This is not unexpected because these cells may be defined as embryonic remnants and can be the origin of lesion-forming cells in primary stapedial otosclerosis (Figs. 1 and 2). In contrast, in non-otosclerotic stapes fixation, no significant TNFRI/II expression could be demonstrated on the surface of osteoclasts or macrophages of bone lesions (Fig. 3). Osteoclasts of otosclerotic foci showed positivity for

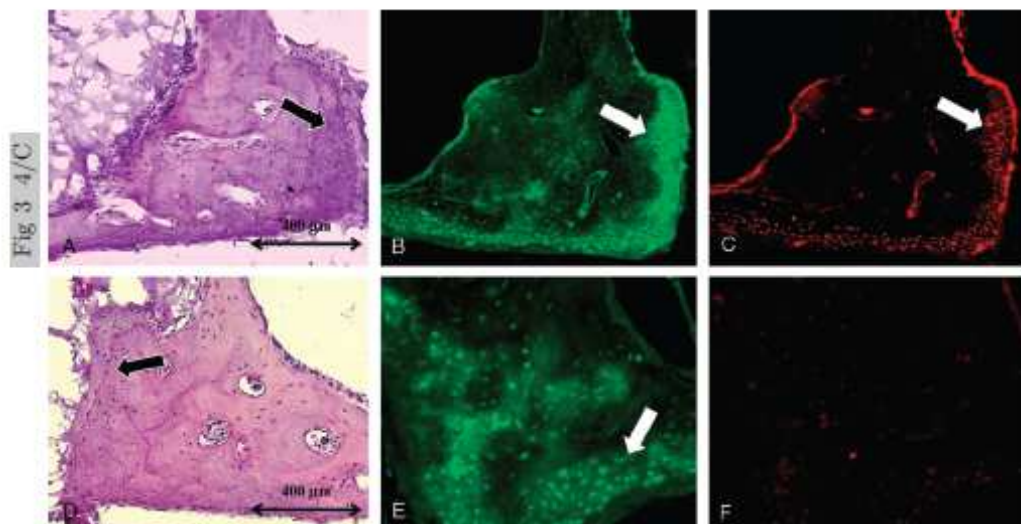


FIG. 2. Immunohistologic representation of TNFRI/II expression in inactive, burnout otosclerosis. **A**, Inactive (Grade III) otosclerotic focus in the anterior pole of the stapes footplate. Hypocellularity, hypovascularization, marked basophilia, and woven pattern of cement lines can be seen (H.E.). The hyaline cartilage layer is deformed (black arrow). **B**, Weak annular TNFRI expression in the previous section. Hyaline cartilage layer of the vestibular surface showing strong TNFRI expression is marked by white arrow. **C**, The lesion-forming cells show negligible TNFRII expression, in contrast to the hyaline cartilage layer (white arrow). **D**, Burnout (Grade IV) otosclerosis. The osteoid substance is hypocellular, avascular, and shows marked eosinophilia. Hyaline layer is marked by black arrow (H.E.). **E**, Weak annular TNFRI expression in the previous section. Hyaline cartilage layer of the vestibular surface showing strong TNFRI expression is marked by white arrow. **F**, Tumor necrosis factor- α receptor II immunoreaction is practically negative.

Otology & Neurotology, Vol. 30, No. 00, 2009

Copyright © 2009 Otology & Neurotology, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

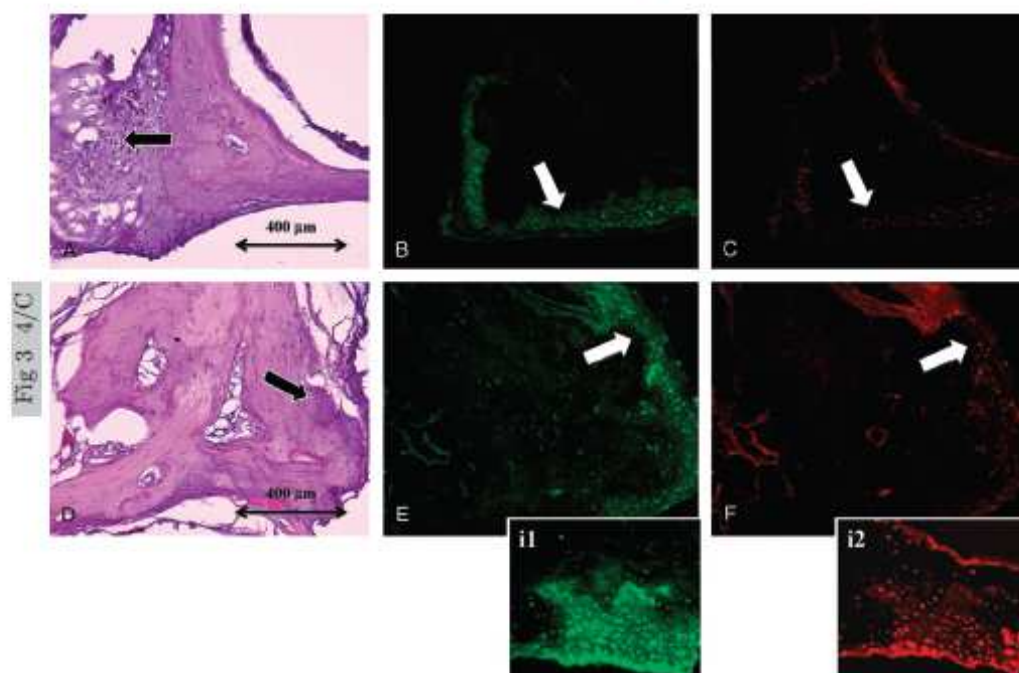


FIG. 3. Immunohistologic representation of TNFR expression in nonotosclerotic stapes fixation. *A*, Globular fibrosis in the anterior pole of the stapes footplate (H.E.). The stapes is almost normal in appearance, and the fibrotic nodule is marked by black arrow. *B*, There is no detectable TNFR expression in the osteoid substance; however, the hyaline cartilage layer gives strong annular immunoreaction (white arrow). *C*, In contrast to the chondrocytes of the hyaline layer (white arrow), the osteocytes do not present TNFR expression. *D*, Annular calcification (H.E.). The footplate is deformed, acellular, the cement lines show lamellar pattern. The hyaline layer is ragged (black arrow). *E*, There is no considerable TNFR expression in the previous section. The hyaline cartilage layer shows strong annular reaction (1; larger magnification). *F*, Unlike the hyaline cartilage (2), osteocytes and osteoblasts do not show TNFR expression.

TNFR and II receptors, indicating active inflammatory bone remodeling in the lesion (Figs. 1 and 2). In these cases, expression levels and patterns of the 2 TNFRs were strongly associated with the histologic grade of otosclerosis (χ^2 test; $p < 0.001$; Table 1). Active otosclerosis (Grades I–II) was represented by wide pseudo-vascular spaces filled by increased numbers of large, multinucleated osteoclasts with strong granular TNFR and also TNFR II antigen expression (Fig. 1). Unlike active stages, advanced otosclerosis (Grades III–IV) was marked by decreased numbers of osteoclasts with weak linear or annular TNFR-specific immunoreaction and by missing TNFR II expression (Fig. 2).

DISCUSSION

Present observations provide additional information for the inflammatory pathogenesis of otosclerosis and for the molecular background of the transition between different histopathologic stages. Overexpression of TNFR and

TNFR II in the early stages of otosclerosis induces an inflammatory osteolytic cascade (Fig. 4). Several inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, transforming growth factor- β) and bone-specific proteins (osteoprotegerin, bone morphogenetic protein, dysastrophic dysplasia sulfate transporter) may play a secondary promoting role in this process (8,9). The endpoint of the increased bone turnover is apoptotic cell death with calcification of the osteoid substance; burnt otosclerosis (1,3,16,17). As to return to previous and current results, different etiopathogenesis of otosclerosis and nonotosclerotic stapes fixations should be distinguished (8,9).

Otosclerotic bone remodeling disorder shows organotropism to the otic capsule. Foci of otosclerosis are limited to the temporal bone, and no lesions have been found outside the ear (1,2). Enchondral ossification develops in the otic capsule and the stapes footplate, and it is completed after 1 year (1,2). Once calcified, the otic capsule exhibits no significant remodeling. Interestingly, there is very low-grade remodeling in these sites

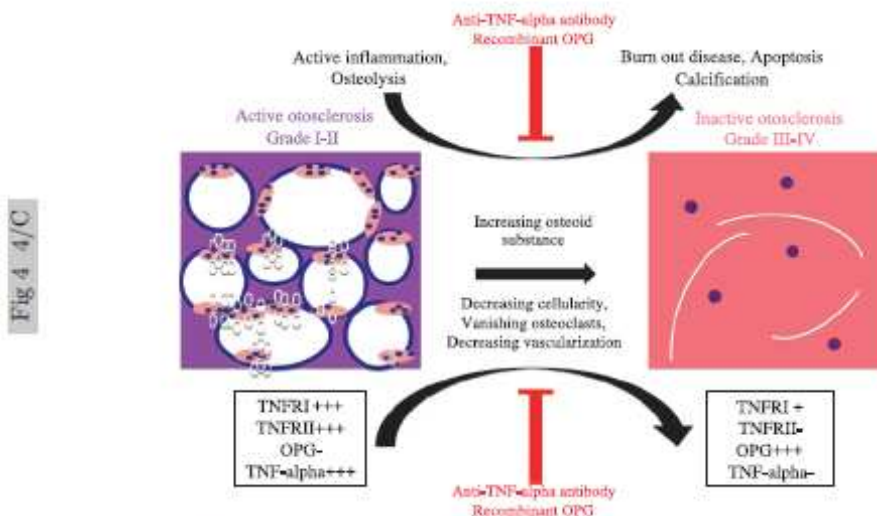


FIG. 4. Schematic diagram of the transition between different histopathologic stages of otosclerosis.

compared with other parts of the skeleton. Bone turnover is almost completely absent within the bone adjacent to the perilymphatic space (1,2). Osteoblastic and osteoclastic activity, normally associated with bone turnover, is rarely, if ever, seen in the adult otic capsule. This otic capsule is formed by 3 bone layers such as the endosteal layer next to the perilymphatic space, the interosseal globules (globuli interossei), which are embryonic cartilage remnants, and the periosteal layer (2). The interosseal globules may be the sites of the earliest otosclerotic foci. The stapes footplate consists of 2 layers of the otic capsule because in this anatomic structure, the endosteal layer is absolutely absent (2). The hyaline cartilage layer of the vestibular surface of the stapes footplate belongs to the middle layer of the otic capsule and can be assumed as an embryonic remnant (2).

Osteoclasts of otosclerotic bone lesions are featured by undifferentiated embryonic phenotype (expression of CD51/61 antigen), in contrast with those observed in nonotosclerotic stapes fixations (18). Osteoclasts showing uncommon CD51/61 antigen expression may derive from the resting embryonic cells of globuli interossei, which cannot be identified in the otosclerotic bone (18). This cellular transformation could explain the absence of these structures observed in manifest otosclerosis (1-3,18). The chondrocyte-like cells forming globuli interossei have a quite slow metabolic activity and persist throughout life without considerable morphologic changes (1). As to suggest our previous hypothesis, however, these cells should be considered as pluripotent embryonic remnants, which could be reactivated and transformed into osteoclasts due to inflammatory response induced by measles virus infection (18). The cur-

rent observations regarding TNFR expression in different stages of otosclerosis and in hyaline cartilage layer of each ankylotic stapes footplates may suggest the confirmation of these results (18). However, further in vitro examinations and tissue culturing will be necessary to confirm these observations in the future.

To date, surgery has become the principal therapeutic tool to improve hearing loss in otosclerosis. However, based on the autoimmune-inflammatory characteristics and the involvement of bone metabolism in the pathogenesis of the disease, pharmacotherapy that includes antiosteoporotic, as well as immunosuppressive, anti-inflammatory agents may also be considered at least in the early, active phases of otosclerosis (19-22).

Current observations may establish the central role of TNF- α and its receptors in the pathologic inflammatory bone remodeling in otosclerosis. Because proinflammatory cytokines, including TNF- α , is abundantly produced in the otosclerotic bone, topical or systemic application of anti-TNF biologics may be a therapeutic option in inflammatory active stages of otosclerosis with SNHL (23,24) (Fig. 4). To date, there has been 1 report regarding the effect of local perfusion of infliximab on autoimmune SNHL (25). In this study, 9 patients, who could not be tapered off corticosteroids or had relapse after the discontinuation of corticosteroids, were treated for 4 weeks with a weekly infusion of infliximab. Hearing thresholds improved in most patients, and corticosteroids could be tapered off after the administration of TNF blocker. Altogether, 7 of 9 patients responded to infliximab therapy (25). Short-term recombinant OPG (OPG-Fc) treatment could also have a powerful potent antiosteolytic effect, principally in early stages of otosclerosis (26,27). There

is a potential use of disrupting RANK-mediated osteolysis and to preserve normal bone remodeling in otosclerosis with inflammatory background (26,27) (Fig. 4). Regarding the modulation of bone metabolism, bisphosphonates are potent strong inhibitors of bone morphogenetic protein synthesis. There has been some clinical evidence suggesting the efficacy of bisphosphonate treatment in early active stages of otosclerosis (28,29). For example, Brookler and Tanyeri (29) demonstrated efficacy of etidronate in the treatment of SNHL associated with otosclerosis. As to our current knowledge regarding the pathogenesis of otosclerosis, anti-TNF- α biologics may have the most specific and powerful effect in the inhibition of otosclerotic bone remodeling disorder.

In conclusion, otosclerosis is a disease of complex bone remodeling disorder of the human otic capsule with yet unexplained etiopathogenesis. There is a genetic predisposition to this disease (30). In addition, viral infection, autoimmunity, inflammatory mechanisms, as well as hormonal and metabolic factors that lead to disturbed bone metabolism may contribute to the pathogenesis of otosclerosis (1,5). Because the diagnosis of otosclerosis is still based on histopathologic examination of the removed stapes footplate, prospective studies based on comprehensive histopathologic and molecular biologic analysis are necessary to get further information regarding the background of disease to develop the most promising medical treatment of SNHL due to far advanced otosclerosis.

REFERENCES

- Chole RA, McKenna MJ. Pathophysiology of otosclerosis. *Otol Neurotol* 2001;22:249-57.
- Friedmann I. *Pathology of the Ear*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications, 1974.
- Iyer V, Gristwood H. Histopathology of the stapes in otosclerosis. *Pathology* 1984;16:30-8.
- Cureoglu S, Schuchert PA, Fedino A, Rinaldo A, Tsipran V, Paparella MM. Otosclerosis: etiopathogenesis and histopathology. *Am J Otolaryngol* 2006;27:334-40.
- Arnold W, Niedermeyer HP, Lehn N, Neubert W, Höfler H. Measles virus in otosclerosis and the specific immune response of the inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1996;116:705-9.
- McKenna MJ, Kristiansen AG, Haines J. Polymerase chain reaction amplification of measles virus sequence from human temporal bone sections with active otosclerosis. *Am J Otol* 1996;17: 827-30.
- Karosi T, Könya J, Szabó LZ, Székely I. Measles virus prevalence in otosclerotic stapes footplate samples. *Otol Neurotol* 2004;25: 451-6.
- Karosi T, Jókay I, Könya J, et al. Detection of osteoprotegerin and TNF- α mRNA in ankyotic stapes footplates in connection with measles virus positivity. *Laryngoscope* 2006;116:1427-33.
- Karosi T, Könya J, Szabó LZ, et al. Codetection of measles virus and tumor necrosis factor- α mRNA in otosclerotic stapes footplates. *Laryngoscope* 2005;115:1291-7.
- Mannel DN, Echtenacher B. TNF in the inflammatory response. *Chem Immunol* 2000;74:141-61.
- Grell M, Wajant H, Zimmermann G, Scheurich P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:570-5.
- Bazin JF. Emerging families of cytokines and receptors. *Curr Biol* 1993;3:603-6.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104: 487-501.
- Wajant H, Pfitzenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003;10:45-65.
- Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002;296:1634-5.
- Kriegler M, Perez C, DeMay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: implications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988;53: 45-53.
- Schulze-Offhoff K, Ferrari D, Las M, Wesselsborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998;254: 439-59.
- Karosi T, Jókay I, Könya J, et al. Activated osteoclasts with CD51/61 expression in otosclerosis. *Laryngoscope* 2006;116: 1478-84.
- Taylor PC. Anti-tumor necrosis factor therapies. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:164-9.
- Sato H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Tumor necrosis factor- α , an initiator, and etanercept, an inhibitor of cochlear inflammation. *Laryngoscope* 2002;112:1627-34.
- Cohen S, Shoup A, Weisman MH, Harris JP. Etanercept treatment for autoimmune inner ear disease: results of a pilot placebo-controlled study. *Otol Neurotol* 2005;26:903-7.
- Street I, Jobanputra P, Proops DW. Etanercept, a tumor necrosis factor α receptor antagonist, and methotrexate in acute sensorineural hearing loss. *J Laryngol Otol* 2006;120:1064-6.
- Székely I. Human otosclerotic bone-derived peptide decreases the gain of the electromotility in isolated outer hair cells. *Hear Res* 1996;95:100-7.
- Wang X, Truong T, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Blockage of immune-mediated inner ear damage by etanercept. *Otol Neurotol* 2003;24:52-7.
- Van Wijk F, Staedler H, Keithley E, Lefebvre PP. Local perfusion of the tumor necrosis factor α blocker infliximab to inner ear improves autoimmune neurosensory hearing loss. *Audiol Neurotol* 2006;11:357-65.
- Zehnder AF, Kristiansen AG, Adams JC, Kujawa SG, Merchant SN, McKenna MJ. Osteoprotegerin knockout mice demonstrate abnormal remodeling of the otic capsule and progressive hearing loss. *Laryngoscope* 2006;116:201-6.
- Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortin Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:457-75.
- Brookler K. Medical treatment of otosclerosis: rationale for use of bisphosphonates. *Int J Otolaryngol* 2008;14:92-6.
- Brookler KH, Tanyeri H. Etidronate for the neurologic symptoms of otosclerosis: preliminary study. *Ear Nose Throat J* 1997; 76:371-6, 379-81.
- Van Den Bogaert K, Govaerts PJ, De Lennin EM, et al. Otosclerosis: a genetically heterogeneous disease involving at least three different genes. *Bone* 2002;30:624-30.

Otosclerosis: Disturbed Balance Between Cell Survival and Apoptosis

*Péter Csomor, *István Sziklai, †Bálint Lektor, †László Z. Szabó, ‡József Pytel, §József Jóri, and *Tamás Karosi

*Medical and Health Science Center, Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, University of Debrecen, Debrecen; †ENT Department, Bajcsy-Zsilinszky Hospital, Budapest; ‡Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, University Medical School of Pécs, Pécs; and §Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, University Medical School of Szeged, Szeged, Hungary

Hypothesis: Otosclerosis is an inflammatory bone remodeling disorder of the human otic capsule, which might be characterized by a disturbed balance between cell survival and apoptosis due to an increased expression of inflammatory cytokines, mainly tumor necrosis factor- α (TNF- α).

Background: Histologic features of otosclerosis have been well described; however, different histopathologic and clinical stages have not been attributed precisely to the molecular biology of the pathologically increased metabolism of bone-forming and bone-resorbing cells.

Methods: Forty ankylosed stapes footplates ($n = 40$, males = 17, females = 23) removed by stapedectomy were histologically analyzed by conventional hematoxylin-eosin staining, and hCIAP1/2 (inhibitors of apoptosis) and granzyme- β (apoptosis inducer) specific immunofluorescent assays were performed. Four normal stapes footplates obtained from cadavers with negative otologic history were used as negative controls.

Results: Active otosclerosis ($n = 19$) was featured by robust expression of apoptosis inhibitor proteins hCIAP1/2 and negli-

gible expression of granzyme- β . Inactive cases of otosclerosis ($n = 8$) were characterized by inverse reaction: granzyme- β was highly expressed; however, hCIAP1/2 specific immunoreactions were absent. Nonotosclerotic and normal stapes specimens showed no considerable little granzyme- β expression and moderate hCIAP1/2-specific immunoreactions. Expression pattern of apoptosis-associated proteins showed strong correlation with the histologic diagnosis and activity of otosclerosis (Yates-corrected χ^2 test, $p < 0.001$).

Conclusion: Detection of the inversely expressed apoptosis inhibitor and inducer proteins in active and inactive stages of otosclerosis demonstrates pathologic regulation of cell survival and apoptosis. These results may suggest active otosclerosis inactivation by TNF- α induced apoptosis. Anti-TNF- α biologics may serve as an option in the medical treatment of active otosclerosis. **Key Words:** Apoptosis—Cell survival—Granzyme- β —hCIAP1/2—Nonotosclerotic stapes fixation—Otosclerosis.

Otol Neurotol 00:00-00, 2010.

Otosclerosis is an inflammatory bone remodeling disorder of the human otic capsule that leads to progressive conductive and/or sensorineural hearing loss (SNHL) as a consequence of stapes footplate fixation and cochlear bone resorption with endosteal involvement (1). Characteristic otosclerotic foci appear only within the bony parts of the otic capsule (1,2). Crura of the stapes are usually not involved because their embryonic origin is different from that of the stapes footplate (1).

An unresolved question is whether active and inactive otosclerosis are different stages of the same bone remodeling disorder or they are independent and unrelated processes? Apart from the immunohistologic and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis of osteoclasts containing measles virus antigens and RNA sequences in the otosclerotic foci, more evidence has been reported suggesting the role of sustained viral infection in the pathogenesis of otosclerosis (2-4).

In active otosclerosis, tumor necrosis factor- α (TNF- α) is suspected to be released from the foci (4,5). Tumor necrosis factor- α may enter into the peri- and Cortilymph and change the electromotility of outer hair cells, resulting in SNHL (5-7). Because TNF- α is produced in the otosclerotic bone, the potential cause of SNHL in otosclerosis might be the TNF- α release. Tumor necrosis factor- α has 2 main types of receptors (8-10). The most important way of TNF- α receptors TNFRI and II-associated signaling is a death domain-mediated and a caspase-associated

Address correspondence and reprint requests to Tamás Karosi, M.D., Ph.D., Medical and Health Science Center, Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, Nagyerdő Krt. 98, H-4002; E-mail: karositamas@gmail.com

This work was supported by Grant OTKA PD75371 from the Hungarian Scientific Research Fund and Grant DE OEC Méc. 17/2008 from the Mecenatum Fund of Debrecen University.

The authors do not have any financial interests in companies or other entities that have an interest in the information in the contribution.

induction of apoptosis (10–12). Tumpr necrosis factor receptor associated death domains of TNF- α receptors bind the Fas-associated death domain containing protein, which recruit the cysteine protein caspase 8 complexes (12). Obtaining the critical concentration, cysteine protein caspase 8 is activated by an autoproteolysis, and the increasing expression of caspase 8 stimulates the effector caspases (caspase 8/9/10/11) leading to apoptosis (10,12).

Apoptosis is a special way of cell death, which is functionally and morphologically different from necrosis (8,9,13). In general, apoptosis is characterized by nuclear chromatin condensation, cytoplasmic shrinking, dilated endoplasmic reticulum and blabbing blebbing of the cellular membrane (12). Mitochondria remain morphologically unchanged (12). The 2 principal pathways of apoptosis are 1) the Bcl-2 inhibitable or intrinsic pathway induced by various forms of stress-like intracellular damage, developmental cues, and external stimuli; and 2) the caspase 8/10 dependent or extrinsic pathway initiated by the engagement of death receptors (8,9,12,13). The caspase 8/10 dependent or extrinsic pathway is a death receptor-mediated mechanism that results in the activation of caspase 8 and caspase 10 (9,12). Activation of death receptors such as Fas/CD95, TNF- α receptor (TNFR) I, and TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) receptor is promoted by the TNF family of ligands, including Fas ligand, TNF- α , lymphotoxin- α (TNF- β), lymphotoxin- β , CD40 ligand, TNF- α superfamily member 14, receptor activator of NF- κ B ligand, and TNF- α superfamily member 13b (14). These ligands are released as a cytotoxic response to viral infections or as part of the cellular immunity responses during the stimulation or survival of CD8⁺ T lymphocytes (cytotoxic T lymphocyte [CTL]) and natural killer (NK) cells (9,12,14).

It was assumed that inflammatory bone remodeling disorder in otosclerosis might be characterized by a disturbed balance of apoptosis inhibitor (hCIAP1/2) and inducer (granzyme- β) proteins due to increased expression of TNF- α . Cellular inhibitor of apoptosis 1 (hCIAP1, baculoviral inhibitor of apoptosis repeat 2) and 2 (hCIAP2, baculoviral inhibitor of apoptosis repeat 3) are members of a family of proteins that inhibits apoptosis by binding to TNF receptor-associated factors (TRAF1, TRAF2) and probably by interfering with activation of interleukin-1 converting enzyme proteases (13,15,16). hCIAP1 inhibits apoptosis induced by serum deprivation of menadione, a potent inducer of free radicals (17,18). In contrast to hCIAP1, hCIAP2 does not affect apoptosis induced by menadione exposure (19). Granzyme- β (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1) is a product of CTL and NK cells (12,18). CD8⁺ T lymphocytes and NK cells share the remarkable ability to recognize specific infected target cells (8,13). They are thought to protect their host by inducing apoptosis of infected cells, bearing on their surface "nonself" antigens, usually peptides or proteins resulting from viral infections (8,9,13). Granzyme- β plays a crucial role in the rapid induction of target cell apoptosis by CTL in cell-mediated immune response (9,13).

This study investigates the expression pattern of apoptosis inhibitor and inducer proteins in the lesion-forming cells of otosclerotic stapes footplates correlated to the histopathologic activity of otosclerosis with the aim of evaluating the molecular background of the transition between different stages of otosclerosis.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Controls

Forty-four individual stapes footplates ($n = 44$; males = 20, females = 24) were histologically analyzed. Forty of them were ankylotic and were removed by stapedectomy ($n = 40$; males = 17, females = 23). The mean age of patients with stapes fixation was 42.19 years (range, 21–67 yr). Stapes footplate specimens were sorted histologically (hematoxylin and eosin [HE] staining) from a larger pool ($n = 217$) of ankylotic stapes samples with the aim to obtain smaller and representative groups of otosclerotic- and nonotosclerotic stapes footplates. Partially removed stapes footplates were not included in the study because of the anterior or posterior poles containing the bone lesions fixing the stapes were retained in the oval window niche. However, fragmented footplates with the possibility of reconstruction during the orientation and embedding were not excluded from the study. The remaining 177 ankylotic stapes footplates represented otosclerosis in 124 cases, whereas nonotosclerotic stapes fixation was histologically diagnosed in 53 specimens. The diagnosis of ossicular chain fixation was based on clinical, audiometric, and tympanometric findings. Air-bone gap at 1,000 Hz was at least 30 dB. Tympanometry revealed Type A (27%) or Type As (73%) tympanograms. Stapes fixation was clinically bilateral in approximately two thirds of the patients; however, only 1 stapes obtained from each patient was analyzed because in this period, only unilateral stapedectomies have had been performed in most of cases. Four stapes footplates were used as negative controls obtained from cadavers with negative otologic history (within 24 h after death; males, 3; women, 1). Four stapes footplates obtained from cadavers with negative otologic histories were used as negative controls (<24 h after death; men, 3; women, 1). The mean age of controls was 53.2 years (range, 48–63 yr). Stapes footplates were collected from February 2009–2008 to December 2009 (Medical Universities of Debrecen, Pécs, Szeged and ENT Department of Bajcsy-Zsilinszky Hospital, Budapest, Hungary). Statistical analysis was performed via automated procedures in SPSS 11.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). To test the association between expression pattern of apoptosis-associated proteins and stapes fixations with different histopathologies, we performed a Yates-corrected χ^2 test using logistic regression. The Hungarian Scientific Research Ethical Committee (ETT-TUEB/2008-113-547/89) approved this study.

Histologic Examination and hCIAP1/2 and Granzyme- β -Specific Immunofluorescent Assay

A total of 44 stapes specimens were immediately fixed in 10% (w/v) formaldehyde and decalcified in 0.5 mol/L sodium ethylene-diamino-tetraacetate (72 h; 4°C). Specimens were embedded in 15% (w/v) purified gelatin (24 h; 56°C) and refixed in 4% (w/v) paraformaldehyde (24 h; 20°C). Blocks were cryoprotected in 20% (w/v) saccharose solution (2 h; 4°C) and sectioned by an MNT cryomicrotome into 10- μ m slides (–40°C; Slee, Mainz, Germany). Slides were stored in 0.1 mol/L phosphate-buffered saline containing 0.02% (w/v) sodium azide at 4°C.

TABLE 1. Expression of hCIAP-1/2 and granzyme- β apoptosis markers in ankylosed and in normal stapes footplates with different histopathologies

Histologic findings (n = 44)	hCIAP-1 ^a	hCIAP-2 ^b	Granzyme- β ^c
Otosclerosis (n = 27)			
Active (n = 19)	++++ (11.2 $\pm$ 1.39)	+++ (10.5 $\pm$ 1.47)	-/+ (0.8 $\pm$ 0.7)
Inactive (n = 8)	- (0)	-/+ (1.1 $\pm$ 0.52)	+++ (16.23 $\pm$ 3.12)
Hyaline cartilage layer	++ (5.29 $\pm$ 2.3)	+++ (5.75 $\pm$ 0.39)	-/+ (2.4 $\pm$ 1.9)
Nonotosclerotic stapes fixations (n = 13)			
Annular calcification (n = 11)	+ (1.94 $\pm$ 0.3)	+ (1.68 $\pm$ 0.3)	- (0)
Hemoidrosis (n = 2)	+ (2.2 $\pm$ 0.3)	+ (2.1 $\pm$ 0.47)	- (0)
Hyaline cartilage layer	++ (4.16 $\pm$ 1.23)	+++ (6.17 $\pm$ 0.85)	- (0)
Normal stapes footplates (n = 4)	++ (3.9 $\pm$ 1.0)	++ (5.4 $\pm$ 1.36)	- (0)
Hyaline cartilage layer	++ (2.9 $\pm$ 0.4)	+++ (6.4 $\pm$ 0.7)	- (0)

^ahCIAP-1: baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis) repeat-containing 1.^bhCIAP-2: baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis) repeat-containing 2.^cgranzyme- β : cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1.

Intensity (relative luminescence with standard deviation) and pattern of immunofluorescent assays: +, weak annular immunoreactivity; ++, weak homogeneous immunoreactivity; +++, strong homogeneous or weak granular immunoreactivity; +++, strong confluent and robust granular reaction; -, negative reaction.

Two consecutive 10- μ m frozen cut sections were examined as follows: 1) staining with hematoxylin and eosin and 2) hCIAP1/2 and granzyme- β -specific immunofluorescent assays. The sections for immunostaining were washed (20 min; 20°C) in 0.2 mol/L PBS containing Protein Block solution (1% [w/v], bovine serum albumin, 0.09% [w/v]; sodium azide, 0.1% [w/v]; Tween-20; BioGenex, San Francisco, CA, USA). Blocked sections were incubated with 0.005 mg/ml polyclonal goat anti-

human hCIAP1-specific antibody solution (100 μ l; 0.02% w/v sodium azide; 20°C; 24 h, continuous shaking; R&D Systems, Birmingham, AL, USA). The first primary antibody was washed rinsed away with 0.2 mol/L PBS. Sections were incubated with 0.005 mg/ml polyclonal donkey anti-human hCIAP2-specific antibody solution (100 μ l; 0.02% w/v sodium azide; 20°C; 24 h; continuous shaking; R&D Systems). The second primary antibody was washed rinsed away with 0.2 mol/L PBS.

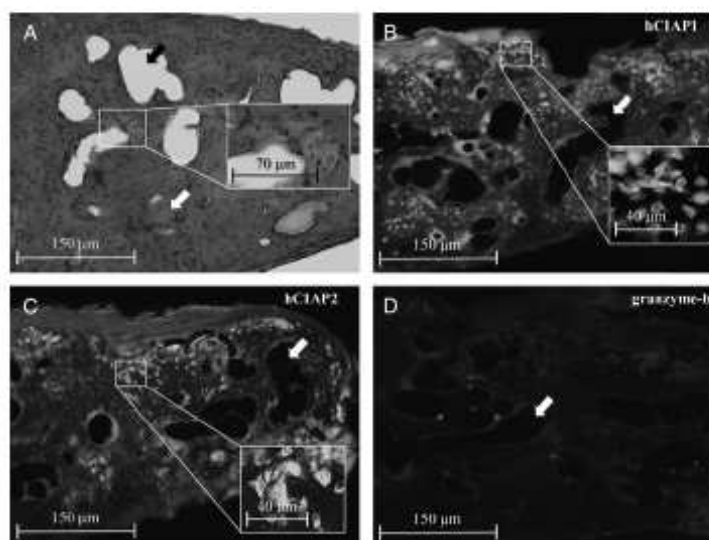


FIG. 1. Immunohistologic representation of hCIAP1/2 and granzyme- β expression in active otosclerosis. *A*, Active otosclerotic focus in the posterior pole of the stapes footplate (H&E). Hypercellularity and wide pseudovascular spaces (black arrow) can be identified. Several pseudovascular, osteolytic lacunae are filled with hyaline-like material (white arrow). *Inserted picture* shows an active multinucleated osteoclast performing osteolysis. *B*, Demonstration of hCIAP1 expression in the previous section. Osteoclasts and osteoblasts show strong homogeneous hCIAP1-specific immunoreaction. The *inserted picture* presents the larger magnification view of hCIAP1 expressing osteoblasts. *C*, hCIAP2-specific immunoreaction shows intense homogeneous cytoplasmic staining. The *inserted picture* presents the larger magnification view of hCIAP2 expressing osteoblasts. *D*, Granzyme- β -specific immunoreaction is practically negative. White arrows (*B*, *C*, *D*) indicate the wide pseudovascular spaces in the otosclerotic focus.

Otolaryngology & Neurology, Vol. 00, No. 00, 2010

Copyright © 2010 Otolaryngology & Neurology, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Finally, the sections were incubated with 0.02 mg/ml monoclonal mouse hybridoma anti-human granzyme- β -specific antibody solution (100 μ l; 0.02% w/v sodium azide; 20°C; 24 h; continuous shaking; R&D Systems). The third primary antibody was washed rinsed away with 0.2 mol/L PBS. Sections were incubated with 0.005 mg/ml Northern Lights donkey anti-goat immunoglobulin G (IgG) labeled by NL-493 fluorochrome (50 μ l; 20°C; 12 h; continuous shaking; R&D Systems). The first secondary antibody was washed rinsed away with 0.2 mol/L PBS. Sections were incubated with the second secondary antibody: 0.005 mg/ml Northern Lights goat anti-donkey IgG labeled by NL-557 fluorochrome (50 μ l; 20°C; 12 h; continuous shaking; R&D Systems). The second secondary antibody was washed rinsed away with 0.2 mol/L PBS. Finally, the sections were incubated with the third secondary antibody: 0.005 mg/ml Northern Lights donkey anti-mouse IgG labeled by NL-637 fluorochrome (50 μ l; 20°C; 12 h; continuous shaking; R&D Systems). The third secondary antibody was washed rinsed away with 0.2 mol/L PBS. All primary and secondary antibodies were obtained from R&D Systems. All antibody incubations were performed in a sterile humid chamber. Slides were covered by UV transparent Promofluor mounting medium (Promocell, Heidelberg, Germany). Imaging was performed under UV-light with 510-nm wavelengths for NL-493, 574 nm for NL557, and 650 nm for NL-637 fluorochrome with 90- to 130-millisecond exposure time. Photographs were archived in jpeg file format

(Axioskop2 MOT, Axiovision 4.0; Zeiss, Jena, Germany). Semiquantitative analysis of immunofluorescent reactions was performed by application of Axiovision 4.0 software. Relative luminescence was calculated in each immunoreaction by using the 3 different excitatory wavelengths. The region of interest consisted of average data of 5 to 10 cells in the central area of the lesions by 40 $\times$ magnification.

RESULTS

Consecutive sections were subjected to HE staining and hCIAP1/2 and granzyme- β -specific immunofluorescent assays. Partially removed stapes footplates were not included in the study except in those specimens that were reconstructed from the fragments during the orientation and embedding. Histologic diagnosis of otosclerosis was established in 27 ankylosed stapes footplates. Among these patients, the otosclerotic foci were seen to be active in 19 stapes footplates and inactive in 8 cases (Table 1, Figs. 1–3). Active otosclerosis was represented by wide pseudovascular spaces filled with increased numbers of large, misshapen, and multinucleated osteoclasts (Figs. 1 and 2). Advanced, inactive stages of otosclerosis were marked by obliterated vascular

FIG. 1–3

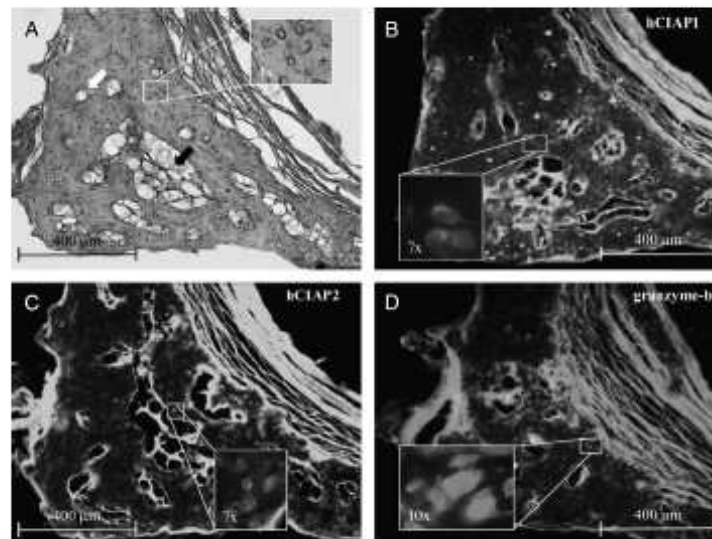


FIG. 2. Immunohistologic representation of hCIAP1/2 and granzyme- β expression in otosclerosis with decreased histopathologic activity. **A:** Otosclerotic focus with moderate activity in the anterior pole of the stapes footplate (H-E). Pseudovascular spaces divided by pseudosepta are indicated by black arrow. A distended blood vessel is marked by white arrow. The osteoid substance is still hypercellular; however, the cement line shows irregular woven and concentric pattern. Osteoclasts and osteoblasts of the otosclerotic focus are presented as empty cellular halos with pale and hypochromatic nuclei. Inserted picture represents osteoclasts with hypochromatic nuclei and moderate activity. **B:** Demonstration of hCIAP1 expression in the previous section. Osteoclasts show considerable hCIAP1-specific immunoreaction. The inserted picture presents the larger magnification view of hCIAP1 expressing osteoclasts. **C:** hCIAP2-specific immunoreaction: weak granular cytoplasmic staining. The inserted picture presents the larger magnification view of hCIAP2 expressing osteoclasts. **D:** Granzyme- β expression shows intense homogeneous cytoplasmic pattern. The inserted picture presents the larger magnification view of granzyme- β expressing osteoclasts.

Otology & Neurotology, Vol. 00, No. 00, 2010

Copyright © 2010 Otology & Neurotology, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

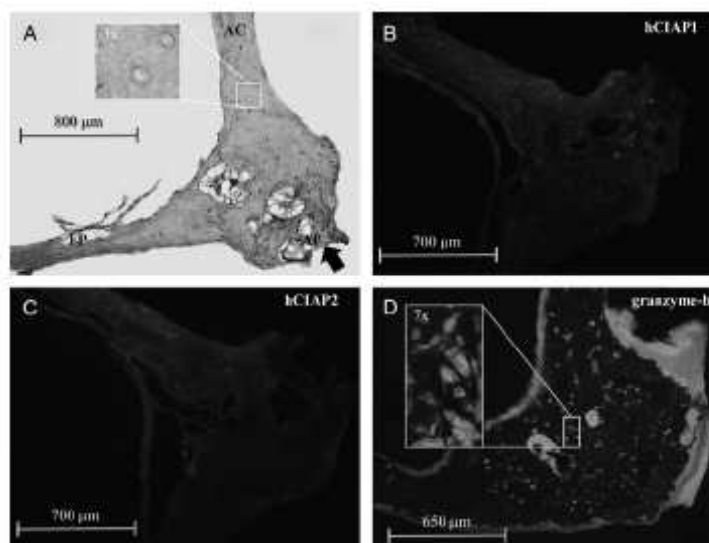


FIG. 3. Immunohistologic representation of hCIAP1/2 and granzyme- β expression in inactive, burned-out otosclerosis. **A**, Inactive otosclerotic focus in the anterior pole of the stapes footplate. Hypocellularity, hypovascularization, marked basophilia, and woven pattern of cement lines can be seen (H&E). The hyaline cartilage layer is deformed (black arrow). AC indicates anterior crus; AP, anterior pole; FP, stapes footplate. *Inserted picture* shows inactive osteoclasts represented by empty cellular halos. **B**, Weak annular hCIAP1 expression in the previous section. **C**, The lesion-forming cells show negligible hCIAP2 expression. *White arrow* shows a blood vessel with hCIAP2 expressing endothelium. **D**, Granzyme- β -specific immunoreaction shows intense homogeneous cytoplasmic staining. The *inserted picture* presents the larger magnification view of granzyme- β expressing cells.

spaces and resorption lacunae with decreased numbers of osteoclasts (Fig. 3). The normal hyaline cartilage layer of the stapes footplate was sharply destroyed by the otosclerotic lesion; vanished chondrocytes in the peripheral zone were represented as empty halos (Figs. 1–3).

In the 13 nonotosclerotic stapes footplates, histologic examinations revealed annular calcification with eosinophilic extracellular matrix, decreased cellularity and hypovascularization ($n = 11$), and hemosiderosis with intense bone remodeling of the stapes footplate ($n = 2$; Table 1, Fig. 4).

Chondrocytes of the hyaline cartilage layer of the vestibular surface of each stapes footplate showed considerable positivity on hCIAP1/2 complex (Table 1, Fig. 4). The hyaline cartilage layer showed negative immunoreaction against granzyme- β (Fig. 4). This is not unexpected because these cells may be defined as embryonic remnants persisting throughout life without manifest signs of apoptosis. These immortalized cells can be the origin of lesion-forming cells in stapedial otosclerosis.

Expression pattern and semiquantitative expression levels of apoptosis inhibitor (hCIAP1/2) and inducer (granzyme- β) proteins were strongly associated with the histologic activity of otosclerosis (χ^2 test, $p < 0.001$; Table 1). Active otosclerosis was represented by wide pseudovascular spaces filled by increased numbers of large, multinucleated osteoclasts with strong granular

hCIAP1 and hCIAP2 antigen expression (Fig. 1). In contrast to hCIAP2, which showed homogeneous cytoplasmic expression, expression of hCIAP1 was characterized by granular perinuclear pattern (Figs. 1 and 2). Active otosclerosis was characterized by negative granzyme- β -specific immunoreaction indicating blocked apoptosis and increased cell survival (Fig. 1). Unlike active stages, advanced otosclerosis was marked by decreased numbers of osteoclasts with weak linear or negative hCIAP1- and hCIAP2-specific immunoreaction (Fig. 3). Inactive otosclerosis was featured by empty cellular halos in HE-stained sections, which showed intense and robust granzyme- β -specific immunoreaction demonstrating active process of apoptosis (Fig. 3).

In contrast to otosclerosis, in nonotosclerotic stapes fixation and in normal stapes footplates, no significant granzyme- β expression could be demonstrated on the surface of osteoclasts or macrophages of bone lesions (Fig. 4). Apoptosis inhibitor proteins hCIAP1/2 showed moderate (physiologic) expression, indicating arrested apoptotic process (Fig. 4).

DISCUSSION

Present observations provide additional information for the pathogenesis of otosclerosis and for the molecular background of the transition between active and inactive

Otology & Neurotology, Vol. 00, No. 00, 2010

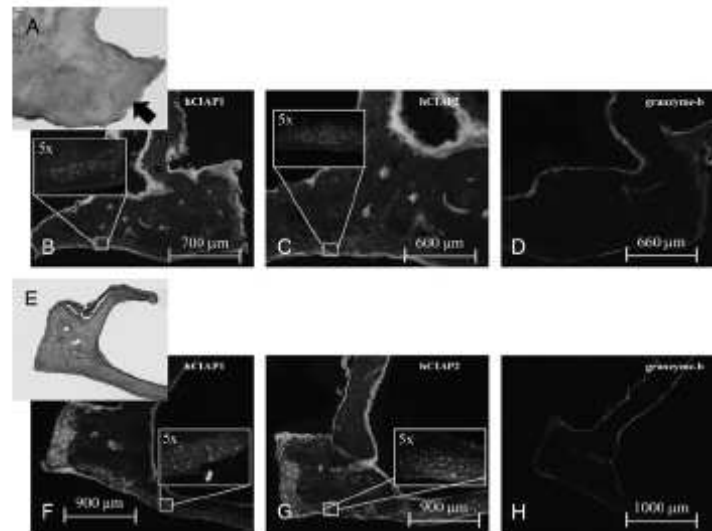


FIG. 4. Immunohistologic representation of hCIAP1/2 and granzyme- β expression in nonotosclerotic stapes fixation and in a normal stapes footplate. *A*, Annular calcification (HE). The footplate is deformed, acellular, the cement lines show lamellar pattern. The hyaline layer is ragged (black arrow). *B*, Weak annular hCIAP1 expression in the previous section. *C*, hCIAP2 shows weak annular expression pattern. *D*, Granzyme- β -specific immunoreaction is negative. *E*, Histologic representation of a normal stapes footplate (HE). *F*, Weak annular hCIAP1 expression in the previous section. *G*, hCIAP2 shows weak annular immunoreaction. *H*, There is no detectable granzyme- β expression in the osteoid substance. Inserted pictures indicate the hCIAP1- and hCIAP2-specific immunoreaction of the hyaline cartilage layers. The chondrocytes show strong annular reaction against apoptosis inhibitor proteins, which is independent from the histopathologic diagnosis.

histopathologic stages. To our knowledge, our study is the first comprehensive report providing morphologic evidence of apoptosis in otosclerotic stapes footplates.

Pathogenesis of the increased bone remodeling in active otosclerosis is still unclear. It is particularly complicated to elucidate in view of the metabolic features of the human otic capsule. Once calcified, the otic capsule exhibits no significant remodeling (1). Bone turnover is almost completely absent within the bone adjacent to the perilymphatic space. Osteoblastic and osteoclastic activity, normally associated with bone turnover, is rarely, if ever, seen in the adult otic capsule (1).

There is a genetic predisposition to otosclerosis (20,21). Most epidemiologic studies on large unselected populations with stapes fixation have suggested autosomal dominant mode of inheritance with incomplete penetrance of approximately 40 to 45% (20,22,23). Furthermore, genetic linkage studies have demonstrated the presence of 8 otosclerosis-associated loci (20,21). Although these loci have been mapped, no specific genes have been identified, and we have no information regarding the molecular process involved in this disease (20,22,23). The main weakness of the genetic studies that authors have made several genetic examinations and linkage analysis in patients with stapes fixation and supposed otosclerosis without histopathologic confirmation (20–23).

Various expression of different splicing isoforms of CD46-type measles virus receptors seems to be the most acceptable explanation for a genetic background and organotropism of otosclerosis (24). The etiologic role of measles virus in the pathogenesis of the otosclerosis arisen in the past fifteen years (1–3). Measles virus shows organotropism to the otic capsule that could be explained by the special pattern of CD46 isoforms in this region. Karosi et al. (24) have reported 4 novel splicing variants of CD46 in otosclerosis: os1, os2, os3, and os4. Newly described CD46 isoforms have shorter or missing transmembrane domain and a rare cytoplasmic domain with pathologic signaling, although virus-binding ability remains conservative (24). It is assumed that one of the most important factors in the pathogenesis of otosclerosis is a consecutive autoimmune reaction due to the continuous viral antigen stimulation of the cellular immune system (1,2). Overexpression of TNFRI/II in active stages of otosclerosis might induce an inflammatory osteolytic cascade (11). Several inflammatory cytokines (TNF- α , interleukin 1, transforming growth factor- β) and bone-specific proteins (osteoprotegerin, bone morphogenetic protein 2/4, and dystrophic dysplasia sulfate transporter) may play a promoting role in this process (4,5,25,26).

Current investigations are parallel with the previously reported disorders in the molecular interaction of the osteoclast-TNF- α -RANK axis (11). Increased expression

of hCIAP1 and hCIAP2 apoptosis inhibitor proteins could be the molecular response to intense TNF- α release mediated by NK cells and osteoclasts in early stages of otosclerosis. Tumor necrosis factor- α acts through its decoy receptors (TNFRI and TNFRII), activates the TNFR-associated factors (TRAF1 and TRAF2), and induces apoptosis due to activation of variable death domains. Inhibitors of apoptosis do not interact with TNF- α or TNFR but associate with TRAF1 and TRAF2 (13,18). hCIAP1 and hCIAP2 can directly bind to TNFR-activated caspase 3 and caspase 7 and inhibit their proteolytic activities (12). Overexpression of apoptosis inhibitors result in increased cell survival, proliferation, and extended osteoclast activation (Fig. 5). As to previous results, average life span of an active otosclerotic focus is approximately 5 to 7 years (1,4,5). During this period, TNF- α and the consecutive hCIAP response run down and result in decreased vascularization and moderate activity of osteoclasts (Fig. 5). The amount of the osteoid substance increases, and osteolytic lacunae and pseudovascular spaces are eventually obliterated. Activated NK cells and CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes show further accumulation in the perivascular spaces of the otosclerotic focus with decreasing activity. This stage is the "histologic healing" of otosclerosis (1); however, on the molecular level, a severe cellular destruction can be considered due

to granzyme- β and perforin release from immune cells (Fig. 5). The molecular cascade of immune-mediated apoptosis starts, whereas increasing osteoprotegerin production leads to further calcification (5). The woven and concentric structure of cement lines turns into lamellar pattern with marked thickening. The end point of the increased bone turnover is an apoptotic cell death with calcification and avascularization of the osteoid substance: burnt out otosclerosis (11) (Fig. 5). As to return to previous and current results, different etiopathogenesis of otosclerosis and nonotosclerotic stapes fixations should be distinguished (4,5,11).

Current observations may establish the central role of TNF- α and TNF- α -mediated apoptosis in the pathologic inflammatory bone remodeling in otosclerosis. Because proinflammatory cytokines, including TNF- α , is abundantly produced in the otosclerotic bone, clinical application of anti-TNF biologics may be a therapeutic option in active stages of otosclerosis with sensorineural hearing loss (27–30).

In conclusion, otosclerosis is a complex bone remodeling disorder of the human otic capsule probably due to the imbalance between cell survival and apoptosis. In addition, genetic factors, viral infection, autoimmune-inflammatory mechanisms, as well as hormonal and metabolic factors that lead to disturbed bone metabolism may contribute to the

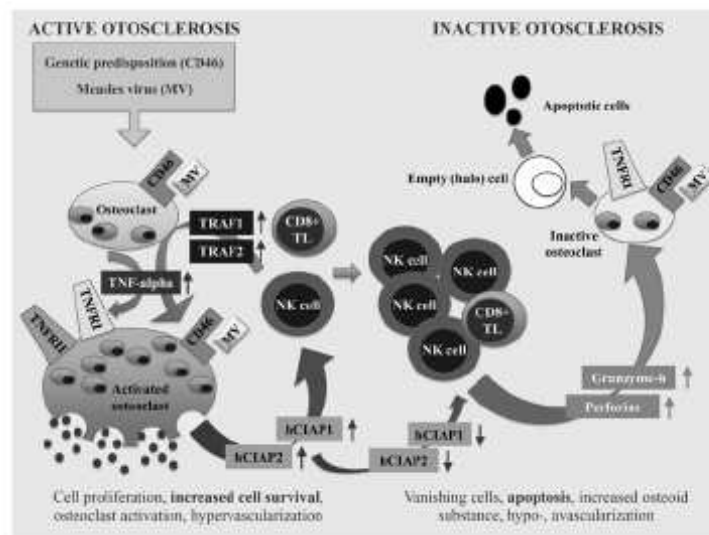


FIG. 5. Schematic diagram of the transition between different histopathologic stages of otosclerosis. Active otosclerosis is characterized by osteoclast activation, increased cell survival, and hypervascularization due to the TNF- α and TRAF release of antigen-stimulated NK cells and CD8⁺ T lymphocytes. Activated osteoclasts recruit osteoclast precursors by further TNF- α expression. As a negative feedback process, expression of apoptosis inhibitors increases, providing cell survival. Inactive otosclerosis is featured by increased amount of avascularized osteoid substance and vanishing osteoclasts. Accumulation of activated immune effectors leads to intense granzyme- β and perforin releases, which result in apoptosis of target cells. CD8⁺ TL indicates CD8-positive T lymphocyte; CD46, measles virus receptor; hCIAP1, human cellular inhibitor of apoptosis 1; hCIAP2, human cellular inhibitor of apoptosis 2; MV, measles virus; TRAF1, TNF- α receptor associated factor 1; TRAF2, TNF- α receptor associated factor 2.

pathogenesis of otosclerosis. Because the diagnosis of otosclerosis is still based on histopathologic examination of the removed stapes footplate, prospective clinical studies based on comprehensive histopathologic and molecular biologic analysis are necessary to get further information regarding the background of disease to find the most acceptable medical treatment of sensorineural hearing loss associated with otosclerosis.

REFERENCES

- Chole RA, McKenna MJ. Pathophysiology of otosclerosis. *Otol Neurotol* 2001;22:249-57.
- Arnold W, Nädemeyer HP, Lehn N, Neubert W, Höfler H. Measles virus in otosclerosis and the specific immune response of the inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1996;116:705-9.
- McKenna MJ, Kristiansen AG, Haines J. Polymerase chain reaction amplification of measles virus sequence from human temporal bone sections with active otosclerosis. *Am J Otol* 1996;17:827-30.
- Karosi T, Könyö J, Szabó LZ, et al. Codetection of measles virus and tumor necrosis factor- α mRNA in otosclerotic stapes footplates. *Laryngoscope* 2005;115:1291-7.
- Karosi T, Jókay I, Könyö J, et al. Detection of osteopontin and TNF- α mRNA in ankylosed stapes footplates in connection with measles virus positivity. *Laryngoscope* 2006;116:1427-33.
- Fujioka M, Kanazaki S, Okano HJ, Masuda M, Ogawa K, Okano H. Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea. *J Neurosci Res* 2006;83:575-83.
- Papp Z, Rezes S, Jókay I, Sziklai I. Sensorineural hearing loss in chronic otitis media. *Otol Neurotol* 2003;24:141-4.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003;10:45-65.
- Chen G, Goeddel DJ. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002;296:1634-5.
- Karin M, Gallagher E. TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF6 signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunity* 2009;22:225-40.
- Csomor P, Sziklai I, Karosi T. TNF- α receptor expression correlates with histologic activity of otosclerosis. *Otol Neurotol* 2009;30:1131-7.
- Wang L, Du F, Wang X. TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 2008;133:693-703.
- Vince JE, Pantaki D, Feltham R, et al. TRAF2 must bind to cIAPs for TNF to efficiently activate NF- κ B and to prevent TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2009;284:35906-15.
- Mahoney DJ, Cheung HH, Mirad RL, et al. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF- α -mediated NF- κ B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:11778-83.
- Vischioni B, van der Valk P, Span SW, Kruijt FA, Rodriguez JA, Giaccone G. Expression and localization of inhibitor of apoptosis proteins in normal human tissues. *Hum Pathol* 2006;37:78-86.
- Bertrand MJ, Douron K, Labbé K, Korneluk RG, Barker PA, Saleh M. Cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors NOD1 and NOD2. *Immunity* 2009;30:789-801.
- Jin HS, Lee DH, Kim DH, Chung JH, Lee SJ, Lee TH. cIAP1, cIAP2, and XIAP act cooperatively via nonredundant pathways to regulate genotoxic stress-induced nuclear factor- κ B activation. *Cancer Res* 2009;69:1782-91.
- Reardon C, Mak TW. cIAP proteins: keystones in NOD receptor signal transduction. *Immunity* 2009;30:755-6.
- Conte D, Holcik M, Lefebvre CA, et al. Inhibitor of apoptosis protein cIAP2 is essential for lipopolysaccharide-induced macrophage survival. *Mol Cell Biol* 2006;26:699-708.
- Moumoulidis I, Axon P, Baguley D, Reid E. A review on the genetics of otosclerosis. *Clin Otolaryngol* 2007;32:239-47.
- Van Den Bogert K, Goverts PJ, De Lennheer EM, et al. Otosclerosis: a genetically heterogeneous disease involving at least three different genes. *Bone* 2002;30:624-30.
- Thys M, Van Den Bogert K, Boudou V, et al. A seventh locus for otosclerosis, OTSC7, maps to chromosome 6q13-16.1. *Eur J Hum Genet* 2007;15:362-8.
- Bel Hadj Ali I, Thys M, Belhaief N, et al. A new locus for otosclerosis, OTSC8, maps to the pericentromeric region of chromosome 9. *Hum Genet* 2008;123:267-72.
- Karosi T, Szalmás A, Csomor P, Könyö J, Petkó M, Sziklai I. Disease-associated novel CD46 splicing variants and pathologic bone remodeling in otosclerosis. *Laryngoscope* 2008;118:1669-76.
- Imachi Y, Lombès M, Lainé P, Stefek G, Ferry E, Grayeli AB. Glucocorticoids inhibit dystrophic dysplasia sulfate transporter activity in otosclerosis by interleukin-6. *Laryngoscope* 2006;116:1647-50.
- Lehndt G, Unkel C, Metz KA, Jahnke K, Neumann A. Immunohistochemical evidence of BMP-2, -4 and -7 activity in otospongiosis. *Acta Otolaryngol* 2008;128:13-7.
- Sziklai I. Human otosclerotic bone-derived peptide decreases the gain of the electromotility in isolated outer hair cells. *Hear Res* 1996;95:100-7.
- Sato H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley IM. Tumor necrosis factor- α , an initiator, and etanercept, an inhibitor of cochlear inflammation. *Laryngoscope* 2002;112:1627-34.
- Cohen S, Shoup A, Weisman MH, Harris JP. Etanercept treatment for autoimmune inner ear disease: results of a pilot placebo-controlled study. *Otol Neurotol* 2005;26:903-7.
- Street I, Jobanputra P, Proops DW. Etanercept, a tumour necrosis factor α receptor antagonist, and methotrexate in acute sensorineural hearing loss. *J Laryngol Otol* 2006;120:1064-6.