

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Dr. Lektor Balázs**

**ÚJ MEGFIGYELÉSEK AZ OTOSCLEROSISOS CSONTÁTÉPÜLÉS  
MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI- ÉS GENETIKAI HÁTTERÉNEK  
MEGISMERÉSÉHEZ**



Témavezető: Dr. Karosi Tamás PhD

DEBRECENI EGYETEM  
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015.

## TARTALOMJEGYZÉK

1. Irodalmi áttekintés.....	4
1.1. Bevezetés.....	4
1.1.1. Meghatározás.....	4
1.1.2. Hallás mechanizmusa, hangátvitel, FEM.....	4
1.1.3. Halláscsökkenések felosztása.....	7
1.1.4. Epidemiológia.....	8
1.2. Történeti áttekintés.....	9
1.3. Csontanyagcsere.....	10
1.4. Az otosclerosis stádiumai.....	13
1.5. Klinikum – a jellegzetes tünetektől a helyes diagnózisig.....	14
1.6. Kezelés napjainkban.....	18
1.7. Gyógyszeres kezelési lehetőségek.....	21
1.7.1. Csontanyagcserére ható szerek.....	22
1.7.2. Gyulladáscsökkentő anyagok.....	25
1.7.3. Célzott (biológiai) terápiás hatóanyagok.....	26
1.8. Az egyedülálló otikus kapszula.....	26
2. Patogenezis.....	30
2.1. Genetika.....	30
2.1.1. Kapcsoltsági tanulmányok.....	31
2.1.2. Asszociáción alapuló tanulmányok.....	32
2.2. Kanyaróvírus és receptorai.....	34
2.3. Környezeti tényezők.....	36
2.4. Hormonális hatások.....	36
2.5. Autoimmunitás – oszteoimmunológia.....	38
3. Célkitűzések.....	39
4. Anyagok és módszerek.....	40
4.1. Betegek és kontrollok.....	40
4.2. Szöveti vizsgálatok.....	43
4.3. I-es típusú kollagén A1 és A2 allélspecifikus immunfluoreszcens próba.....	45
4.4. I-es típusú kollagén A1 és A2 allélspecifikus RT-PCR.....	46

4.5. BMP 2, 4, 5 és 7-specifikus immunfluoreszcens próba.....	47
4.6. RAAS-specifikus immunfluoreszcens próba.....	48
4.7. Genotipizálás.....	49
4.8. Power calculation.....	49
4.9. Asszociációs tesztelés.....	49
5. Eredmények.....	51
5.1. COL1A1 és COL1A2.....	51
5.2. BMP 2, 4, 5, 7.....	56
5.3. RAAS.....	62
5.4. Asszociációs tanulmány.....	67
6. Megbeszélés.....	69
7. Új megfigyelések.....	75
8. Összefoglalás.....	76
9. Summary.....	77
10. Tárgyszavak.....	78
11. Keywords.....	78
12. Köszönetnyilvánítás.....	79
13. Irodalomjegyzék.....	80
14. Függelék.....	90

# 1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 1.1. Bevezetés

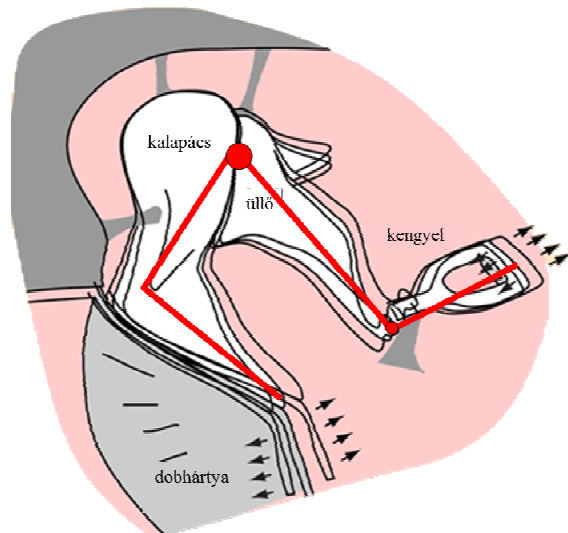
### 1.1.1. Meghatározás

Az otosclerosis a temporális csontban elhelyezkedő hártvás labirintus csontos tokjának (otikus kapszula) primer, gyulladással járó csontanyagcsere zavara. A betegség rendkívül összetett etiopatomechanizmusának jelentős része mindmáig tisztázatlan<sup>1,2</sup>. Az otosclerosis különlegessége, hogy apró góccok alakulnak ki az otikus kapszulában és a vele együtt fejlődő stapes talpban. Az emberi otikus kapszulán kívül egyéb lokalizációban, vagy más emlősben otosclerosis-szerű csontlézióról nem számoltak be<sup>3</sup>. A betegség predilekciós helye a *fissula ante fenestram*, ahol a kialakuló, majd folyamatosan növekvő otosclerotikus fókuszok fizikailag szűkítik az ovális ablak fülkáját és akadályozzák az itt elhelyezkedő stapes talpat a mobilitásában<sup>1,2</sup>. A stapes fixáltsága a külső hangingerek természetellenes csillapítását eredményezi, mely vezetési halláscsökkenésben nyilvánul meg. Az otikus kapszula más régióiban elhelyezkedő góccok fülzúgáshoz, szenzorineurális halláscsökkenéshez és forgó jellegű szédüléshez (vertigo) is vezethetnek<sup>4</sup>.

### 1.1.2. Hallás mechanizmusa, hangátvitel, FEM

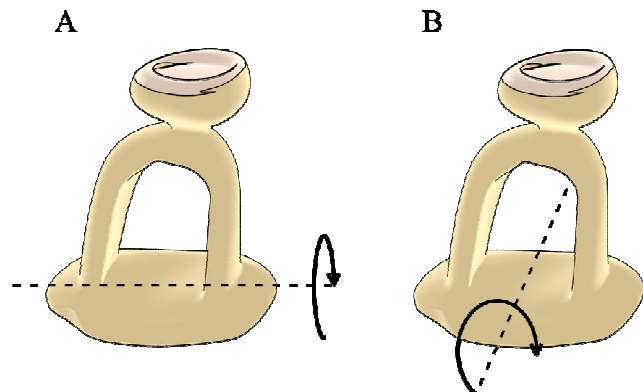
A hallás fizikai alapjainak áttekintése nélkülözhetetlen a klinikai tünetek és a jelenlegi kezelés megértéséhez. Fiziológiai körülmények között a környezetből érkező hangok longitudinális rezgéshullám (sűrűsödés-ritkulás) formájában érik el a fület. A fülkagyló a hallás szempontjából nem alapvetően szükséges képződmény, hanggyűjtő funkciója is csökevényes, azonban kulcsszerepet játszik a hangforrás lokalizálásában (írányhallás). A külső hallójárat rezonátor tulajdonságú, saját rezgési frekvenciája 2,5-4 kHz körül van, ami nagyjából a beszéd frekvencia-tartományának felel meg, emiatt a dobhártyához érkező rezgéseknek néhány dB-lel megnöveli a hangnyomás szintjét. A hangterjedés a levegőből (külsőfül) a folyadékba (belsőfül) meglehetősen nagy veszteséggel jár, ugyanis az energia túlnyomó része (99,9%) a határfelületről visszaverődik. Ennek az impedancia egyenlőtlenségnek a kiküszöbölésében mutatkozik meg a középfül lenyűgöző szerepe úgy,

hogy ezt az energia veszteséget pótolja két egyszerűnek tűnő mechanizmussal. Először is a dobhártya (55 mm<sup>2</sup>) és a kengyeltalp (3,2 mm<sup>2</sup>) méretarányából 17-szeres erősítés adódik, másodsor pedig a hallócsontláncolat kétkarú emelőrendszere további 1,3-1,5-szörös erősítést eredményez, melyek additív módon 26,7 dB-es hallásnyereséghez vezetnek. Az audiológia ezt a folyamatot impedancia-illesztésnek, magát a középfület pedig impedancia-transzformátornak nevezi, pusztán a technikai analógia alapján<sup>5</sup> (1. ábra).



**1. ábra** A középfül mechanikájának sémás ábrázolása. Megfigyelhető a dobhártya felszínének és az ovális ablak fülkéjének az eltérő átmérője, ezenfelül a hallócsontláncolat kétkarú emelőrendszere is.

A dobüregben található két apró izom a *m. stapedius* és a *m. tensor tympani*. Ezek az igen erős intenzitású hangokkal szemben védik a belfület (pl. stapedius-reflex) úgy, hogy reflexes összehúzódásukkal merevítik a hallócsontláncolati rendszert. Sajnálatos módon, a hirtelen bekövetkező impulzusszerű zajokkal szemben képtelenek védelmet biztosítani, ugyanis latencia idejük viszonylag hosszú, több mint 10 ms. Az izmokon kívül még egy védőmechanizmussal rendelkezik az emberi fül, mégpedig a kengyeltalp két különböző tengely körül való mozgásával. Békésy György (magyar származású orvosi Nobel-díjat nyert biofizikus) megállapította, hogy a stapestalp gyengébb hangok esetében keresztirányú tengelye, míg erősebb hangok esetében a hosszanti tengelye körül mozog, így az általa keltett rezgés amplitúdója nyilvánvalóan kisebb lesz<sup>5</sup> (2. ábra).

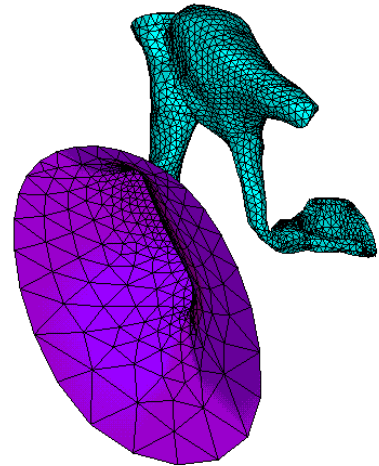


**2. ábra** Békésy György elmélete szerint a stapes talp forgástengelye normális (A) és erős hang intenzitásra (B) jelen ábra alapján változik meg.

Jelenleg a középfül mozgásmintázatának leírására a „finite element model”-t (FEM) használják, mely egy matematikai módszeren (végeses elemes módszer) alapul. Lényege, hogy egy bonyolult formájú térbeli alakzat is leírható kis közelítéssel véges számú sokszögek

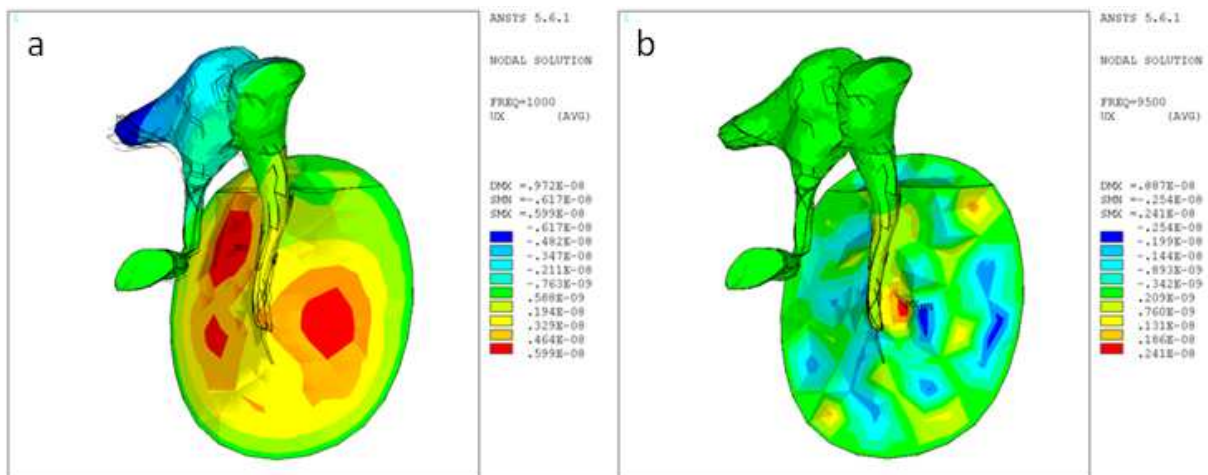
(általában háromszögek) összegeként. A modellben az elemek csak sarokpontjaikon kapcsolódnak egymáshoz és az itt kialakuló csomópontok elmozdulása között lineáris összefüggés van. Mindebből összeállítható az elemek merevségi mátrixa, melyekből számíthatóvá válik az egész alakzat mozgásmintázata (3. ábra).

Az elmúlt tizenöt évben az új technikáknak (pl. lézer doppler vibrometria) köszönhetően megváltozott a hallócsontláncolatról alkotott véleményünk. Békésy 1936-ban és 1941-ben rigid testeknek gondolta a hallócsontokat, ahol a malleus és az incus rotációs mozgással, míg a stapes pusztán dugattyúszerű (piszton-szerű) mozgással bír. *Funnell és Laszlo* 1978-ban kiadott közleménye lavinát zúdított a korábbi elképzelésre, melyben elsőként használtak FEM-t egy macska dobhártyájának szimulációjához<sup>6</sup>. Azóta a FEM segítségével több *in vivo* humán kísérlet is zajlott. Mára a hallócsontláncolat fiziológiás mozgásáról kiderült, hogy az éppen közvetített



**3. ábra** A hallócsontláncolat és a dobhártya ábrázolása a végeleemes módszer (FEM) segítségével. *Abel és mtsai.*

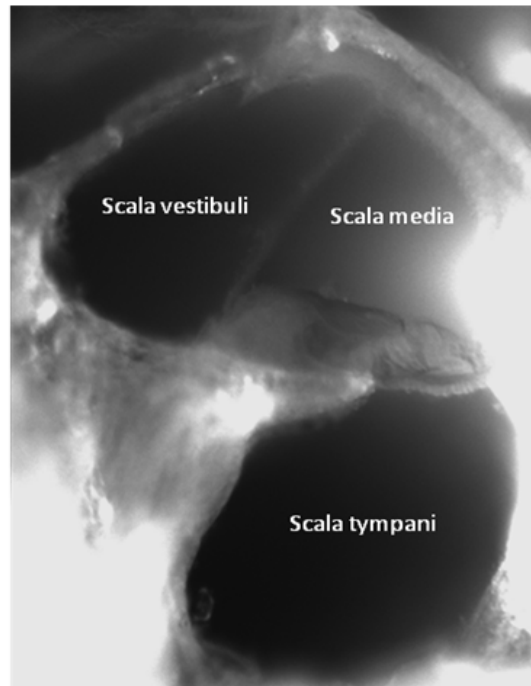
rezgés frekvenciájától függ és kifejezetten széles tartományban tükrözi a mozgás mintázatát. 1 kHz alatt az ép hallócsontláncollal végzett vizsgálatok túlnyomórészt a stapes talp piszton-szerű mozgásáról számoltak be. Azonban 1 kHz felett a talp mozgása jóval komplexebbé vált, megnövekedett a rotációs mozgások száma a talp mindkét tengelye mentén és nagyjából 6 kHz környékén tetőzött az elmozdulások maximuma<sup>7</sup>. A hallócsontláncolati struktúrák rezonancia maximum értékei 3 kHz, 4 kHz és 8 kHz-nél jelentkeztek<sup>8</sup>. Továbbá azt is



**4. ábra** A dobhártya és a hallócsontláncolat elmozdulásának bemutatása 1 kHz (a) és 9,5 kHz-es (b) frekvencián 80dB SPL hangnyomással stimulálva. Az egyre vörösebb árnyalatok mutatják az egyre jelentősebb elmozdulást. *Abel és mtsai.*

bebizonyították, hogy a korábbi stapes sebészeti módszerekhez képest az ovális ablakban megnövelt rezgést továbbító felület fokozottabb membrana basilaris kitéréssel és nagyjából 13 dB-es hallásnyereséggel jár<sup>9</sup> (4. ábra).

A környezet levegőjéből a dobhártyának átadott rezgések a hallócsontláncolaton keresztül eléri a stapes talpat, ami a *foramen ovale*-ban elmozdul, sematikusan abba benyomódik és onnan visszahúzódik. A rezgéseket közvetlenül a perilympa folyadéktere veszi át, ezáltal nyomáskülönbség keletkezik a *scala vestibuli* és a *scala tympani* között, a *membrana basilaris* a *scala tympani* felé tér ki, majd visszatérve eredeti helyzetébe, túl is leng azon. Ezzel a Corti-féle szervben lévő szőrsejtek ingerületbe kerülnek és az információ a *n. cochlearis*-on keresztül továbbítódik az agy felé (5. ábra).



**5. ábra** 15 napos nőtény egér cochlea átmetszet a bazális kanyarulatban a szerző saját anyagából, mely az emberi cochlea anatómiai viszonyaihoz nagyon hasonló. A bal oldalon elhelyezkedő világosabb tüskeszerű képződmény a lamina spiralis ossea, melynek folytatása a membrana basilaris. Utóbbin helyezkedik el a Corti-féle szerv és jól kivehető a Reissner membrán is. A két membrán választja el egymástól a scala vestibulit, scala mediát és a scala tympanit.

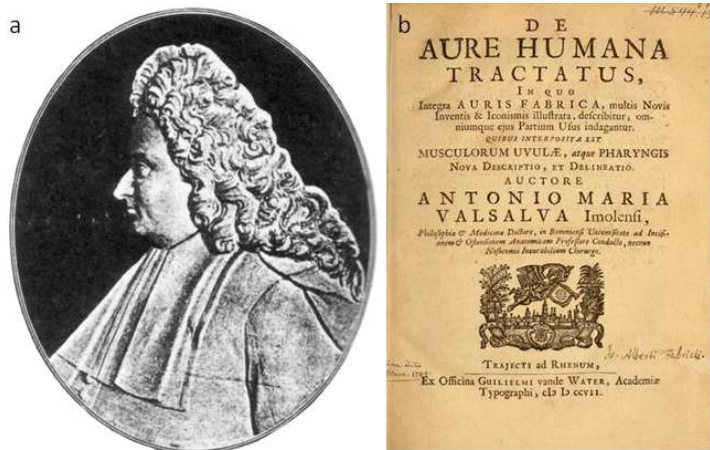
### 1.1.3. Halláscsökkenések felosztása

Mai tudásunk szerint a hallásromlásokat eltérő lokalizációjuk és viselkedésük alapján osztályozzuk. Amennyiben a hangrezgés útjába a fülkagyló és a stapes talp között kerül akadály vagy folytonossági hiány, *vezetési halláscsökkenésről* beszélünk, mely az esetek döntő többségében javítható. A stapes ankylosisok, melyek jelen disszertáció alapját képezik, a vezetési halláscsökkenések csoportjába tartoznak. A belsőfül folyadékterétől a hallóideg proximális végéig előforduló zavart *szensorineurális (idegi) halláscsökkenésnek* nevezzük, mely leggyakrabban nem hozható helyre (bizonyos helyzetekben a cochleáris vagy agytörzsi implantáció szóba jöhet). A fent említett két féle hallászavar elhelyezkedésének elkülönítése ennyire azért nem egyszerű, ugyanis bizonyos belsőfül betegségek (például a felső félkörös ívjárat dehiszcencia, SSCD) is járhatnak vezetési halláscsökkenéssel („harmadik ablak”

teória), annak ellenére, hogy a defektus a belsőfül térségére korlátozódik. Természetesen a vezetékes és az idegi rendellenesség nem zárja ki egymást, így egyszerre is képesek fennállni egy adott fülön, mely jelenséget *kevert típusú halláscsökkenésnek* nevezzük.

#### 1.1.4. Epidemiológia

A *klinikai* otosclerosis (feltételezett stapes fixáció, ép dobhártya melletti Rinne negativitás és Gellé változatlan) incidenciája a felnőtt kaukázusi populációban 0,3-0,38%, míg a vezetékes hallászavarral bírók között nagyjából 18-25%<sup>4,10</sup>. A szubklinikai (*szövetteni*) otosclerosis jóval gyakoribb, szövettanilag igazolt kórbonctani leletek tanúsága szerint a fehér populáció temporális csontjának 8-11%-ában találhatóak panaszt nem okozó otosclerotikus fókuszok<sup>2,4</sup>. Furcsa módon az afrikai és az ázsiai népességben nagyjából tizedannyi (0,03-0,1%) otosclerosis figyelhető meg, mint az európaiban<sup>2</sup>. A nemek között is eltérés tapasztalható, miszerint a betegség 2-3-szor gyakrabban fordul elő nőkben, mint férfiakban<sup>2</sup>. Túlnyomórészt 30-40 éves korban manifesztálódik, és igazi irodalmi ritkaságnak számít pubertás kor előtti megjelenése<sup>2</sup>. Érdekességképpen megemlíthető, hogy öt éves kor alatt egyáltalán nem található otosclerosis a temporális csontok autopsziás anyagaiban<sup>1</sup>. Az elmúlt 50 év távlatából megállapítható, hogy a tünetek egyre idősebb korban manifesztálódnak<sup>11</sup>, ugyanakkor figyelemreméltó összefüggés látott napvilágot, miszerint a késői megjelenés általában lassú hanyatlást, míg a korai manifesztáció rapid progressziót jelent<sup>1</sup>.



6. ábra Antonio Maria Valsalva olasz anatómus (a) és műve a *De Aure Humana Tractatus* (b).

## 1.2. Történeti áttekintés

Majdnem háromszáz évvel ezelőtt, 1735-ben *Antonio Maria Valsalva* bolognai anatómus és sebész egy siket páciens post mortem vizsgálata során a stapest mozgásképtelennek találta (ankylosis) az ovális ablak fülkéjében. Észrevételeit a „*De Aure Humana Tractatus*” című könyvében örökítette meg az utókor számára, mely feltehetőleg az első otosclerosisban szenvedő beteg leírása volt (6. ábra). A későbbiek során több közlemény látott napvilágot siket emberek stapes ankylosisáról autopsziás vizsgálatok eredményeképpen. A leginkább figyelemreméltó



7. ábra Schwartz-tünet, az aktív otosclerosisra jellemző otomikroszkópos kép.

*Joseph Toyne* 1659 db temporális csont disszekciójáról szóló beszámolója. Megfigyelése alapján a sükettség egyik leggyakoribb oka az ovális ablakban lévő stapes csontos ankylosisa.

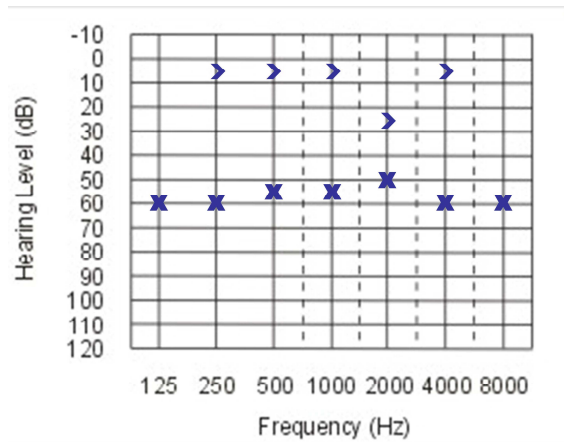
1873-ban *Hermann Hugo Rudolf Schwartz*, német fülész, észrevétele szerint a stapes fixációs betegek körülbelül 10%-ában a dobhártyán rózsaszínes elváltozás tűnik át. Ennek magyarázata a gócból felszabaduló különféle mediátorok hatására a promontoriumra terjedő aktív otosclerotikus gócot fedő nyálkahártya kifejezett vazodilatációja, melyet azóta Schwartz-tünetként aposztrofálunk (7. ábra). 1881-ben *Anton von Trötsch* hibásan azt feltételezte, hogy a dobüregi nyálkahártya szklerotizációja okozza a stapes fixációt, így először használta az oto-„sclerosis” kifejezést eme betegséggel kapcsolatban. 1893-ban talán minden idők egyik legnagyobb fülész professzora, a magyar származású *Politzer Ádám* írta le a betegség igazi természetét szövettani



8. ábra Politzer Ádám magyar származású, méltán híres fülész professzor.

vizsgálatai alapján (8. ábra). Rávilágított többek között arra is, hogy a halláscsökkenést nem krónikus középfülgyulladás következtében létrejött stapes ankylosis, hanem a labyrinth

kapszulájának primer megbetegedése okozza. *Friedrich Bezold* 1908-ban tanulmányozta az otosclerosis jellegzetes klinikai tüneteit és összefoglalta a jellemző audiológiai eltéréseket. Majd 1912-ben *Friedrich Siebenmann* a porózusabb és kevésbé denz csontállomány miatt a korábbi otosclerosis terminus helyett az „otospongiosis” kifejezést javasolta, mely sokkal találóbb a kezdeti csontban zajló elváltozásokra, azonban a terminus változatlan maradt. *Raymond Thomas Carhart*-tól származik az igen hasznos „csont-lég köz” kifejezés, melyet a stapes fixáció sajátos audiológiai konfigurációjára vezetett be.



Emellett észlelte a 2000 Hz-es frekvencián egyedülálló módon kialakult csontvezetési küszöbemelkedést, amelynek a fixáció sebészi megszüntetése után nyoma vész. Eme audiológiai jelenséget azóta „Carhart-csipké”-nek nevezi a szakirodalom<sup>1,12</sup> (9. ábra).

9. ábra 2 kHz-en kialakult csontvezetési Carhart-csipke, mely a stapes fixáció (pl. otosclerosis) egyik legjellemzőbb audiológiai jellemvonása.

### 1.3. Csontanyagcsere

A csontanyagcsere szabályozása kettős természetű. A jól ismert endokrin rendszeren kívül a csontszövetben egy komplex és kifinomult kölcsönhatásokból álló helyi hálózatot azonosítottak oszteoblasztok, oszteoklasztok és számtalan nemrég identifikált mediátor között. A csontlebontást (reszorpció) és felépítést szigorúan szabályozott egyensúly tartja fenn citokinek és egyéb mediátorok szofisztikált összjátéka által<sup>13</sup>. A monocita/makrofág család progenitor sejtjeinek fúziója által alakulnak az oszteoklasztok sokmagvú óriássejteké, hogy ellássák elsődleges feladatukat, a csontreszorpciót. Az oszteoblasztok a csont felépítéséért felelnek, szerepük a csontanyagcsere modulálásában nélkülözhetetlen<sup>14</sup>. Fiziológias környezet esetén a lebontó és felépítő folyamatok szimultán futnak, és fenntartják az egyensúlyt a csontmetabolizmusban<sup>15</sup>.

A „receptor activator of nuclear factor kappa B ligand” (RANKL) a legtöbb sejt felszínén expresszálódik, beleértve az oszteoblasztokat is. Az oszteoklasztokon elhelyezkedő specifikus RANK receptor aktivációján keresztül a RANKL kötődése elősegíti az oszteoklasztok differenciálódását és aktivációját<sup>15</sup>. Állatkísérletes adatok tanúsága szerint a

RANKL-deficiens egerekben az oszteoklasztok hiánya miatt oszteopetrózis fejlődik ki, míg a RANKL parenterális adagolása normális egerekben oszteoporózist eredményez<sup>15</sup>.

Az osteoprotegerin (OPG) erőteljesen gátolja a csontreszorpciót és jelentősen csillapítja az oszteoklasztogenezist. Az OPG egy szolubilis „csali” receptor, mely a RANK-kal verseng a RANKL-ért. Így, az oszteoklasztokon és prekursoraikon jelen lévő RANK-ot az OPG kompetitív módon gátolja, ezzel a lebontó sejtek csökkent differenciálódását és rövidebb túlélését potenciózza. Sőt, elfojtja az oszteoklaszt aktivációt és facilitálja az apoptózisukat is<sup>14,15</sup>. Jelentősen emelkedett OPG mRNS szinteket mutattak ki otosclerotikus *ligamentum spirale*-ban, a Corti-féle szerv támasztó sejteiben és a *limbus spiralis* interdentális sejteiben. Mindemellett a perilympa is meglehetősen magas koncentrációban tartalmazott OPG-t. Immunhisztokémiai vizsgálat segítségével a csontos otikus kapszulában nem volt kimutatható OPG expresszió. Mindebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az OPG feltételezhetőleg a cochlea lágy szöveteiben keletkezik, majd innen szekretálódik a perilymphába, aminek segítségével az otikus kapszula lakunokanalikularis rendszerét használva szüntelenül diffundál a környező csontba<sup>15,16</sup>. Az egészséges otikus kapszula elenyésző csontforgalommal bír, és valószínűleg a nagy mennyiségű OPG miatt majdnem teljesen oszteoklaszt-mentes<sup>17</sup>. Elképzelhető, hogy ez az egyik oka annak, hogy az otikus kapszula mind morfológiájában, mind fejlődésében páratlan az emberi szervezetben<sup>15,16</sup>.

A fertőzött oszteoklasztok, oszteoblasztok, fibroblasztok és endotél sejtek felszínén MHC I molekulák közbenjárásával hiányos kanyaróvírus antigének expresszálódnak. Ennek hatására, CD8+ T-sejt függő immunválasz vezet TNF- $\alpha$  felszabaduláshoz és konszekutív csontlebonláshoz<sup>18</sup>. Ez a leginkább elképzelhető koncepció, bár az aktivált monociták, makrofágok, T- és B-sejtek és oszteoklasztok is képesek az oszteolitikus fókuszba TNF- $\alpha$ -t kiválasztani, és így állandó jelleggel továbbra is fenntartani a gyulladást<sup>19,20</sup>. A TNF- $\alpha$  egy pro-inflammatorikus citokin, ami elengedhetetlen szerepet játszik a csontvelőből származó mononukleáris sejtek oszteoklaszttá és a strómális sejtek oszteoblaszttá történő differenciálódásában. Ez a citokin az oszteoklasztok és az oszteoblasztok közötti intercelluláris kommunikáció nélkülözhetetlen parakrin mediátora. Az emelkedett TNF- $\alpha$  koncentráció stimulálja az oszteoklaszt aktivációt, facilitálja a RANKL expressziót és emellett csökkenti az oszteoklaszt apoptózist is. Így rövid távon oszteolízishez, míg hosszú távon a csont elszivacsosodásához vezet<sup>16,20</sup>. A korai otosclerosisban végbemenő TNF- $\alpha$  túltermelődés az OPG szekréció gátlásának és a RANKL termelődés fokozásának kettős

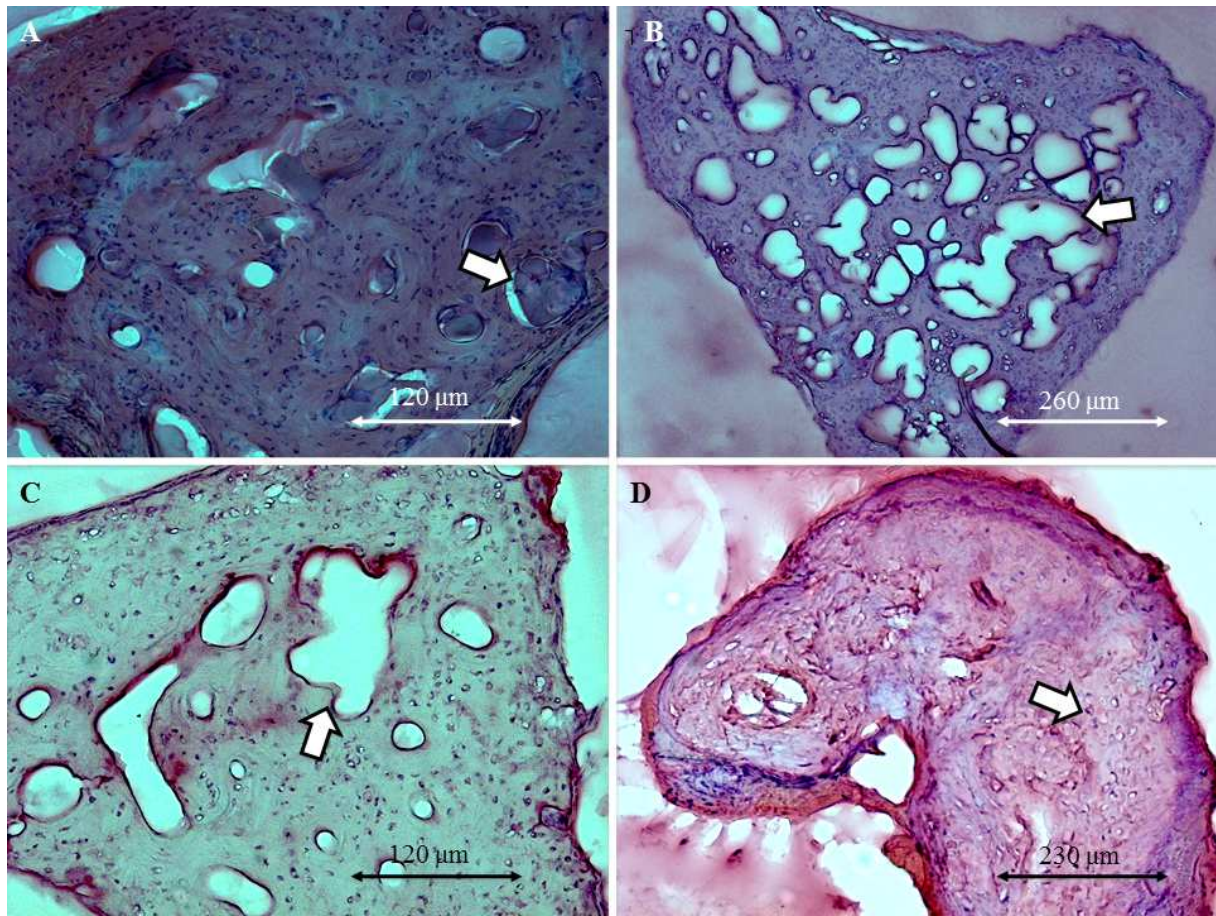
hatása által tovább stimulálja az oszteoklaszt képződést<sup>21</sup>. A TNF- $\alpha$  ugyanazokat a csatornákat (lakunokanalikuláris rendszer) felhasználva, mint az OPG – a perilymphából az otikus kapszulába vándorlása során – képes bekerülni a perilymphába és a cortilymphába is. A TNF- $\alpha$  gátolja a külső szőrsejtek elektromotilitását, ezzel sensorineurális hallászavart válthat ki. Mivel az otosclerotikus góc állítja elő a TNF- $\alpha$ -t, így elképzelhető, hogy az otosclerosisban előforduló sensorineurális halláscsökkenés hátterében is a bőségesen felszabaduló TNF- $\alpha$  áll<sup>22</sup>.

Otosclerosisban a TNF- $\alpha$  és a proteolitikus enzimek a RANKL/OPG rendszertől függetlenül is részt vehetnek a csontreszorpció folyamatában. A cathepsinek szerepe régóta feltételezett a betegség patogenezisében, például a cathepsin B és D expresszió az otosclerosis aktivitásával szoros összefüggésben áll<sup>23</sup>. A korai gyulladást és a csontreszorpciót megnövekedett csontképződés és szklerotizáció követi. Manapság a szárnynélküli fehérje, a Wnt- $\beta$ -catenin rendszer jelentősége merül fel az oszteoblaszt aktiváció és a csontfelépülés folyamatában<sup>24</sup>. A Sclerostin és a Dickkopf-1 (DKK-1) fehérje a Wnt és ezáltal a csontképződés gátlószerei is<sup>24,25</sup>. Így a RANKL/OPG rendszeren kívül a Wnt/DKK-1 Sclerostin egyensúly is befolyásolja a csontremodelláció jelenségét. Érdekes azonban, hogy a TNF- $\alpha$  nem csak elősegíti a csontfogyást a RANKL indukciója által, hanem képes stimulálni a DKK-1-et és indirekt módon blokkolni a Wnt-mediált csontfelépülést<sup>24,25</sup>. Sajnálatos azonban, hogy csak nagyon kevés információ érhető el a Wnt- $\beta$ -catenin/sclerostin-DKK-1 rendszer lehetséges szerepéről otosclerosis esetén, mindemellett a Wnt-t és a cél-génjét sikerült azonosítani a belső- és a középfül különböző részein<sup>13</sup>.

Egy igen fontos citokin, a „transforming growth factor  $\beta$ ” (TGF- $\beta$ ) is bonyolítja az otosclerosis patogenezisét. A TGF- $\beta$ 1 a legnagyobb mennyiségben megtalálható növekedési faktor az emberi csontban. Kritikus szerepet játszik a mezenchimális sejtek oszteoblasztá történőérésének előmozdításában. Továbbá befolyásolja a mátrixképződést, a szöveti fibrózist és a mineralizációt is. A TGF- $\beta$  kölcsönhatásba kerül a legtöbb jól ismert jelátviteli útvonallal az oszteoblaszt működése kapcsán, többek között a Wnt- $\beta$ -catenin rendszerrel<sup>3,26</sup>. Korábban már említésre került, hogy az otosclerosisban létrejövő csontreszorpciót követő fibrózis és csontújdonképződés „repair” mechanizmusnak tekinthető<sup>2,4,27</sup>. Ezen folyamatokban szerepet játszó, TGF- $\beta$  szupercsaládba tartozó „bone morphogenetic protein”-ek (BMP) is komplikálják az otosclerosis patogenezisét<sup>3,28</sup>.

#### 1.4. Az otosclerosis stádiumai

Az otosclerotikus gócok szövettani jellegzetességei módfelett eltérnek egymástól a cellularitás mértékében, oszteoblasztok és oszteoklasztok számában, vaszkularizáció fokában és az extracelluláris kollagén mátrix mennyiségében, melyek alapján egymással összefüggő, ugyanakkor egymástól jól el is különülő négy stádiumot különböztetünk meg<sup>13</sup>. A szövettani felosztás hematoxilin-eozin-nal (HE) festett metszetek alapján történik, melyeken megfigyelhető a betegség aktivitásának különböző állomásai. Kezdetben a hipervaszkularizált oszteolítikus gócok HE festéssel jellegzetes sötétkekes (bazofil) színezetűek és elképesztően sejtdúsak. Nagymennyiségű sokmagvú oszteoklaszt, fibroblaszt és proliferáló endotél sejt felelős a megnövekedett metabolikus aktivitásért, az oszteolízis következtében kialakult másodlagos szivacsos szerkezetért és a hyalinnal kitöltött tág pszeudovaszkuláris terekért<sup>13,19</sup>. Jelen szerkezetet a csontkollagén fibrillumok tekervényes hálózata uralja. Ezt az összképet nevezzük az otosclerosis kezdeti, szövettanilag megerősített *aktív* stádiumának (I. grádus). Ezt követően a *mérsékelten aktív* stádium (II. grádus) érvényesül, melyben a pszeudovaszkuláris terek kiszélesednek és kiürülnek. A góc még mindig bazofil és hypercelluláris, azonban eltűntek az aktív oszteoklasztok a metszetből. Erre a megnövekedett csontreszorpcióra válaszolva oszteoblaszt és fibroblaszt vezérelt regeneratív folyamat indul be a gyulladással fókuszban, mely fibrózus átalakuláshoz vezet. Az oszteoid állomány egyre inkább eozinofil jelleget ölt és sejtszegénnyé válik. Elszórtan még oszteociták figyelhetők meg a csontállományban, azonban az üres oszteolítikus lakúnák dominálnak az *inaktív* stádiumban (III. grádus). Végül az intenzív eozinofil festődésű lézió kifejezetten sejtmentessé válik, lemezes szerkezetű oszteoid uralja a képet, melyet *kiégett* végstádiumnak (IV. grádus) tartunk<sup>13,19</sup>. Következésképpen az otosclerosis szövettani aktivitásának megjelenését I-IV-ig osztályozhatjuk. Az első két stádiumot pongyolán aktívnak, míg az utolsó kettőt inaktívnak szokás nevezni<sup>4</sup>. Az otosclerotikus lézió életútja egy hosszú folyamat, melyet a korábban említett sajátságok alapján követhetünk végig. A gócok átlagos életideje hét év a kialakulástól a teljes kimerülésig. Az otikus kapszulában adott pillanatban különböző stádiumban lévő fókuszok egyidejűleg lehetnek jelen<sup>1,2</sup> (10. ábra).



**10. ábra** Az otosclerosis haematoxin-eozin festéssel megállapított stádiumai. Az aktív stádium (A) kifejezetten sejtdús, basofil jellegű. A mérsékelten aktív grádusra (B) a tág pszeudovaszkuláris terek és az oszteoklasztmentesség jellemző. Az inaktív stádiumban (C) a metszet sejtsegény és inkább eozinofil. Végül a kiégett (D) végstádium uralja a képet.

### 1.5. Klinikum – a jellegzetes tünetektől a helyes diagnózisig

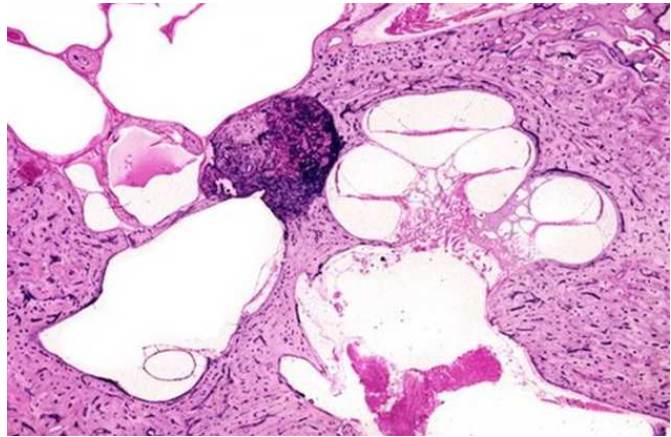
Az otosclerosis tünetei a kapszula otikában kialakuló góccok elhelyezkedésétől függenek<sup>12</sup>. Ahogy már korábban említésre került, leggyakrabban az ovális ablak peremén (*fissula ante fenestram*) vagy a stapes talpban jelenhetnek meg gyulladásos fókuszok, amelyek növekedése mechanikailag fixálja a stapes talpat a fülkében, és ezzel vezetékes halláscsökkenést hoznak létre<sup>29</sup> (11. ábra). A pericochlearis régióban létrejövő otosclerotikus góccok, szenzorineurális halláscsökkenéshez vagy fülzúgáshoz (tinnitus) vezethetnek. Ilyen esetekben a folyamat eléri a csontos cochlea endoszteumát és feltehetőleg a gócból felszabaduló proteolitikus enzimek és citokinek (TNF- $\alpha$ ) direkt módon károsítják a szőrsejteket<sup>4,30,31</sup>. Ennek analógiájaként perilabyrinth lézió esetén a betegek szédüléses

epizódokról (vertigo) számolnak be. A korábban felsorolt tünetek önmagukban vagy egymással bármilyen kombinációban előfordulhatnak<sup>2,31</sup>.

Az otosclerosis általánosságban romló hallásról panaszkodó fiatal felnőttek (30-40 év) betegsége, akiknél operációs mikroszkópos fülvizsgálat során ép dobhártyát és légtartó dobüreget találunk. Anamnézisében általában évek óta fennálló, progresszíven romló uni- vagy bilaterális<sup>12</sup> (70-80%-ban) hallásromlás szerepel<sup>32</sup>. Nő betegek gyakorta írják le a halláscsökkenést lépcsőzetes jellegűnek, ahol a hallásvesztés leginkább hormonális változashoz köthető (terhesség, laktáció, fogamzásgátló szedés, menopauza).

A fizikális és eszközös kivizsgálás alkalmával a hallócsontláncolati fixáció tényét állapíthatjuk meg, melyek túlnyomó többsége stapes ankylosis. Otomikroszkópos vizsgálat során az esetek mintegy 10%-ában áttűnik a dobhártyán a promontoriumot érintő aktív otosclerotikus góc nyálkahártyájának fokozott vazodilatációja, mely a hátsó-alsó negyedben rózsaszínes foltként jelenik meg (Schwartz vagy flamingó-tünet)<sup>12,30,32</sup> (7. ábra). A dobhártya folyamatos, szintben álló és transzparens. Féloldali stapediális otosclerosis esetén a Weber-teszt az érintett fülbe lateralizál. A Rinne-teszt a halláscsökkenés mértékétől függően lehet pozitív vagy negatív, azonban a Gellé-teszt stapes fixáció esetén mindig változatlan. Fül-orr-gégészeti szakmai irányelvek szerint az 1024 Hz-es (C3) hangvilla Rinne negativitása alapján (kb. 25 dB-es vezetési halláscsökkenés) állítjuk fel a műtéti indikációt. Érdekességképpen kiemelendő, hogy neves külföldi fülsebészek 1024 Hz-en történő Rinne pozitív ellenére audiogramon megjelenő 15 dB-es csont-lég köz esetén már hallásjavító műtetet (stapes sebészet) javasolnak<sup>33</sup>.

Hallászavar kivizsgálása esetén az audiológiai vizsgálatokat kötelező elvégezni. Általánosságban a tisztahang küszöbaudiometriás vizsgálat dominánsan mély frekvenciákra terjedő vezetési halláscsökkenést mutat. A betegség tipikus audiológiai jele 2 kHz-en a csontvezetési küszöb 25 dB-es emelkedése, melyet „Carhart-csipke”-ként tart számon az

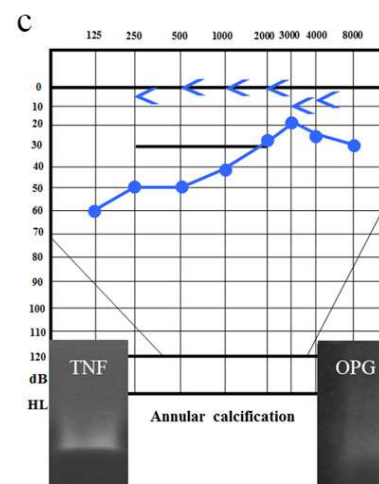
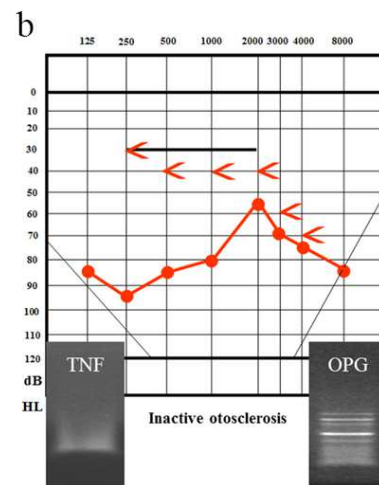
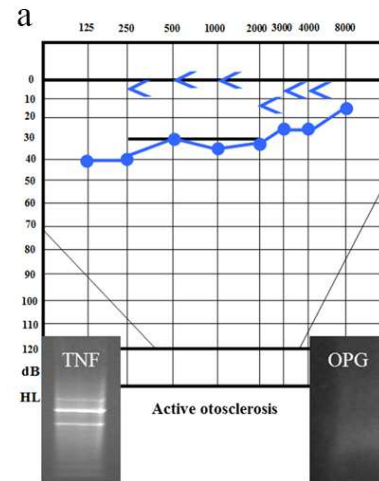


**11. ábra** Hematoxin-eozin-nal festett metszeten található otosclerotikus góc a *fissula ante fenestram*-ban, mely involválja a talp mellső részét és eléri a cochlea bazális kanyarulatát. Előbbi hatására akadályozza a stapest a mozgásban és vezetési halláscsökkenést okoz. <http://quizlet.com/10159972/otology-flash-cards/>

irodalom (9. ábra). Ezen abnormalis jelenséget mai tudásunk szerint a középfül megváltozott rezonanciája okozza, aminek maximuma 2 kHz-re esik. További bámulatot a Carhart-csipke eltűnése stapes műtét után, ekkor ugyanis a stapes fixáció megszűnésével a középfül visszanyeri eredeti rezonátor funkcióját, így egyedülálló módon „eltűnik” a már korábban kialakult ideginek tünt halláscsökkenés<sup>32</sup>. Említést érdemel még az „overclosure” jelensége, mely során a kevert típusú halláscsökkenésben szenvedő páciens csontvezetési hallásküszöbe stapes műtét után a kiindulási értékhez képest javulást mutat.

Kutatócsoportunk korábbi megfigyelései alapján, több apró klinikai jellegzetesség együttállása esetén a stapes fixációk diagnózisa bizonyos mértékben jósolhatóvá vált. *Karosi és mtsai* rávilágítottak arra, hogy a *nem-otosclerotikus stapes fixációs* esetek küszöbaudiometriás vizsgálatánál elhanyagolható szenzorineurális halláscsökkenés és körülbelül 50 dB-es, dominánsan mély frekvenciás csont-lég köz található. *Aktív otosclerosis*ban enyhe fokú (0-20 dB) idegi halláscsökkenés és 30-35 dB-es csont-lég köz detektálható. Ezekről jelentősen eltér az *inaktív otosclerosis*, ahol átlagosan 45 dB-es idegi zavarra még ezen felül 35 dB-es vezetési komponens rakódik<sup>4,10</sup> (12. ábra).

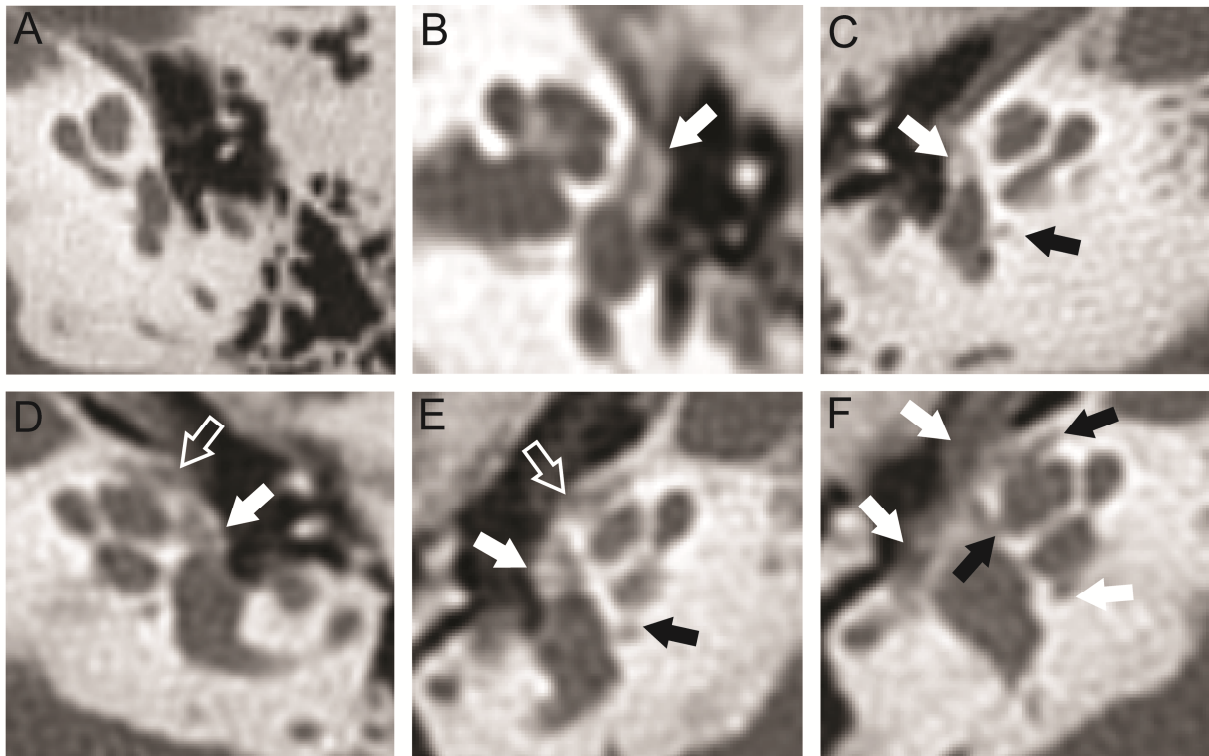
A preoperatív tympanometria az esetek kétharmadában As-típusú, míg a maradék részben A-típusú görbét eredményez. A tympanometriás vizsgálatnak



**12. ábra** Az otosclerotikus és a nem-otosclerotikus stapes fixációk audiológiai jellegzetességei, melyek kapcsolatban állnak a TNF- $\alpha$  és az OPG mRNS expressziójával is. Az aktív otosclerosis (a) enyhe vezetési halláscsökkenéssel jellemezhető, ahol a TNF- $\alpha$  expresszió emelkedett míg OPG kifejeződés nem detektálható. Az inaktív otosclerosisban (b) közepes fokú kevert halláscsökkenés mutatható ki, elhanyagolható TNF- $\alpha$  és fokozott OPG expresszió mellett. A nem-otosclerotikus stapes fixációk kiterjedt (majdnem 60 dB-es) vezetési halláscsökkenést reprezentálnak, TNF- $\alpha$  és OPG negativitás mellett.

egyébként is igen szerény a diagnosztikus értéke, így elvégzése stapes műtét előtt nem is kötelező érvényű. A multifrekvenciás tympanometria lehetővé teszi a középfül rezonancia-frekvenciájának meghatározását, mely frekvencián a legkisebb a hangvezető rendszer ellenállása, így a legkisebb energiaveszteséggel történik a hang továbbítása. A normális tartománynál magasabb rezonancia-frekvencia hallócsontláncolati fixációra utal. A korai stádiumban a stapediuss-reflex „on-off” jelenséget mutat, mely a betegség progressziójával teljesen megszűnik és reflex már nem detektálható<sup>32</sup>.

Egyéb izgalmas fenomének is megfigyelhetők otosclerotikus betegeknél. A *Willis-féle paracusis* jelensége a betegek azon képessége, miszerint telefonon vagy zajos környezetben sokkal jobban hallanak, nyilvánvaló vezetékes nagyothallásuk ellenére. Magyarázatként szolgálhat az, hogy a zajos környezet miatt beteg csont-lég közénél nagyobb hangerővel beszél a környezetük, ezáltal a hallás nem, de a beszédértés javul. A *Weber-féle paracusis*



**13. ábra** Marshall-féle stádiumbeosztás alapvetően az otosclerosisos betegek cochlearis implantációjához készült, annak eldöntésére, hogy cochlearis vagy fenestrális otosclerosisról van szó. 0. grádus: az otikus kapszulában nincs jele manifesztálódó hipodenz lézióknak (A). I. grádus: kizárólag fenestrális lézió és/vagy stapes talp megvastagodás (B). II.a. grádus: meglévő vagy hiányzó fenestrális érintettség és hipodenz lézió a cochlea bazális kanyarulatánál (C). II.b. grádus: meglévő vagy hiányzó fenestrális érintettség és hipodenz lézió a cochlea apikális kanyarulatánál (D). II.c. grádus: meglévő vagy hiányzó fenestrális érintettség és hipodenz lézió a cochlea bazális és apikális kanyarulatánál egyaránt (E). III. grádus: az egész otikus kapszula diffúz vagy konfluáló érintettsége (F).

egyfajta belső „túlhallás”, amely a páciens leginkább rágás közben zavarja. Ebből adódóan a beteg beszéde étkezés közben elhalkul, főként jelentős háttérzaj esetén<sup>1</sup>.

A preoperatív diagnosztikában képalkotó vizsgálatoknak is van létjogosultsága. A „high-resolution computed tomography” (HRCT) érzékenysége aktív otosclerosis esetén 76%, míg inaktív otosclerosisban már csak 61% és nem-otosclerotikus stapes fixáció kapcsán igen alacsony, körülbelül 50%. Az otosclerotikus gócok az otikus kapszulában hipodenz lézióként fordulnak elő, melyet Marshall szerint osztályozhatunk<sup>34</sup> (13. ábra). A HRCT képen látható gócok általában nem befolyásolják a műtétet, sőt csekély információ tartalmuk miatt elvégzésük nem is kötelező érvényű, azonban segítséget nyúlhatnak az esetleges idegi hallásromlás predikciójáról. Mindemellett ezen képalkotó modalitás igazi szerepe az, hogy ki tudja zárni a felső félkörös ívjáratihiszcenciát, megállapíthatja a kongenitális kerek ablak obliterációt és információt szolgáltat az *aqueductus vestibuli* tágasságáról, hogy ne alakulhasson ki intraoperatív perilympa „gusher” (gejzirként előtörő és elállíthatatlan perilympa kiáramlás, mely az operációt ellehetetleníti)<sup>34</sup>. A „cone-beam computed tomography” (CBCT) a HRCT-nél jóval kisebb sugár dózissal átvilágító, alapvetően fogászati modalitás, mely az aktív otosclerotikus gócot 100%-os érzékenységgel detektálja. Sajnálatos módon az inaktív fókuszokat az eljárás képtelen kimutatni<sup>35</sup>.

Mindezek fényében érthető, hogy a stapes fixáció diagnózisát már gyaníthatjuk a fizikális vizsgálatok, hangvilla tesztek és audiológiai leletek tükrében<sup>32</sup>. Exploratív tympanotomia során intraoperatív diagnózisként a stapes ankylosisát is meghatározhatjuk, azonban az otosclerosis diagnózisa kizárólag az eltávolított stapes szövettani feldolgoása és elemzése után állapítható meg, mely rutin klinikai vizsgálat során nyilván nem lehetséges. A stapes ankylosisok pusztán kétharmadát okozza otosclerosis, a maradék egyharmadot az úgynevezett nem-otosclerotikus stapes fixációk alkotják. Ide tartozik az annuláris kalcifikáció, globuláris fibrózis, limfocitás infiltráció, haemosziderózis, granulómák és az amyloidosis is<sup>36</sup>.

## 1.6. Kezelés napjainkban

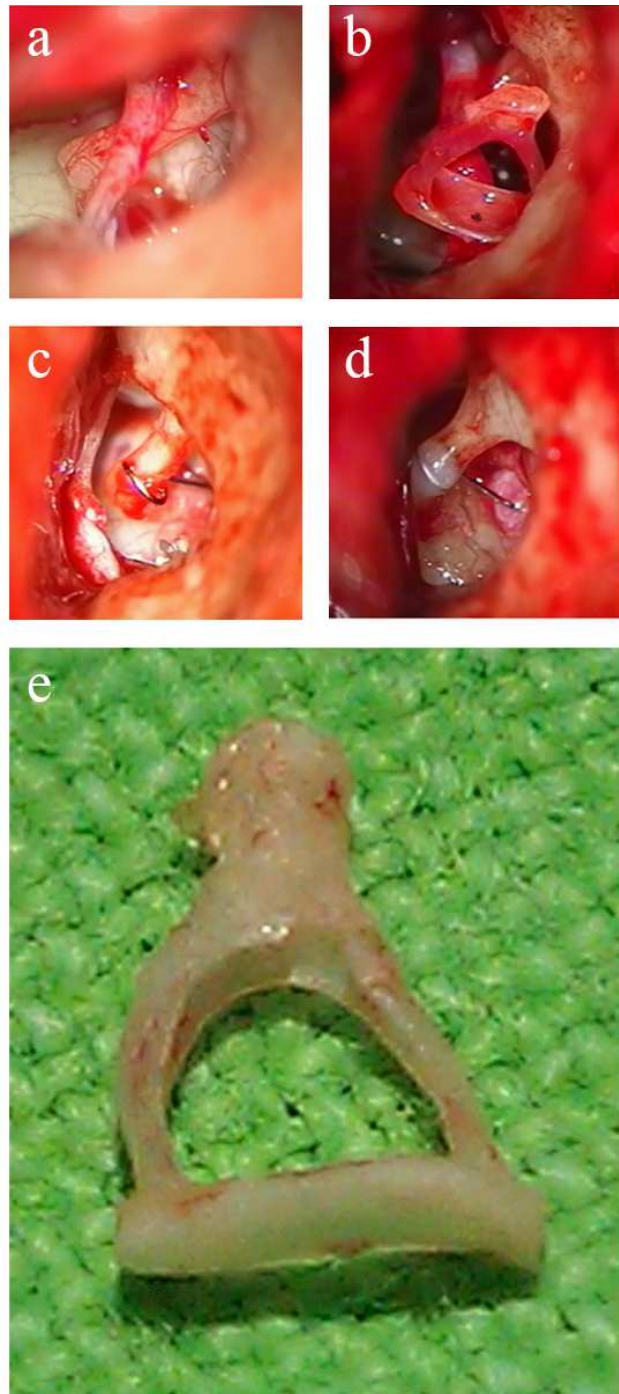
A stapes sebészet komoly anatómiai felkészültséget és igen kimagasló manualitást kíván. Szövődményveszélye és a potenciálisan vele járó életminőség romlás miatt az Amerikai Egyesült Államokban (USA) és az Egyesült Királyságban (UK) legtöbbször nem is vállalják fel ennek kockázatát az orvosok és helyből hallókészülékkel látják el a betegeket<sup>37</sup>.



sebészetből és a protézis fülkébe helyezése után gyakran az obliteráció csak spongostan behelyezést jelent.

A stapes mikrosebészet kizárólag a vezetékes halláscsökkenés helyreállításában bizonyulhat sikeresnek<sup>38</sup>, ugyanis mind a mai napig a szenzorineurális hallásvesztés (kevés kivételtől eltekintve) az orvostudomány számára gyógyíthatatlan.

A fent említett műtétek közös jellemzője, hogy a belsőfül megnyílik, emiatt sterilitási szabályok fokozott betartása szükséges. A számtalan középfül műtéttől eltekintve ilyenkor a belsőfül szövődmények kockázata megsokszorozódik (szenzorineurális halláscsökkenés tinnitus és vertigo 0,3-1%-ban előfordul). Stapes sebészeti műtetet tilos (abszolút kontraindikáció) fertőzött vagy atelektáziára hajlamos (rossz fülkürt funkció) középfülben, szimultán fennálló cholesteatoma vagy dobhártya perforáció esetén, és felső félkörös ívjáratihelyi dehiszcenciában végezni. Szisztémás vagy helyi fertőzés (pl. az ajak herpesz is) minimum három hetes műtéti prolongációt jelent. A tág aqueductus vestibuli perilympha gushert jelezhet előre, mely az erélyes antikoaguláns kezeléssel együtt relatív műtéti kontraindikációt képez. Kontraindikáció fennállása esetén annak



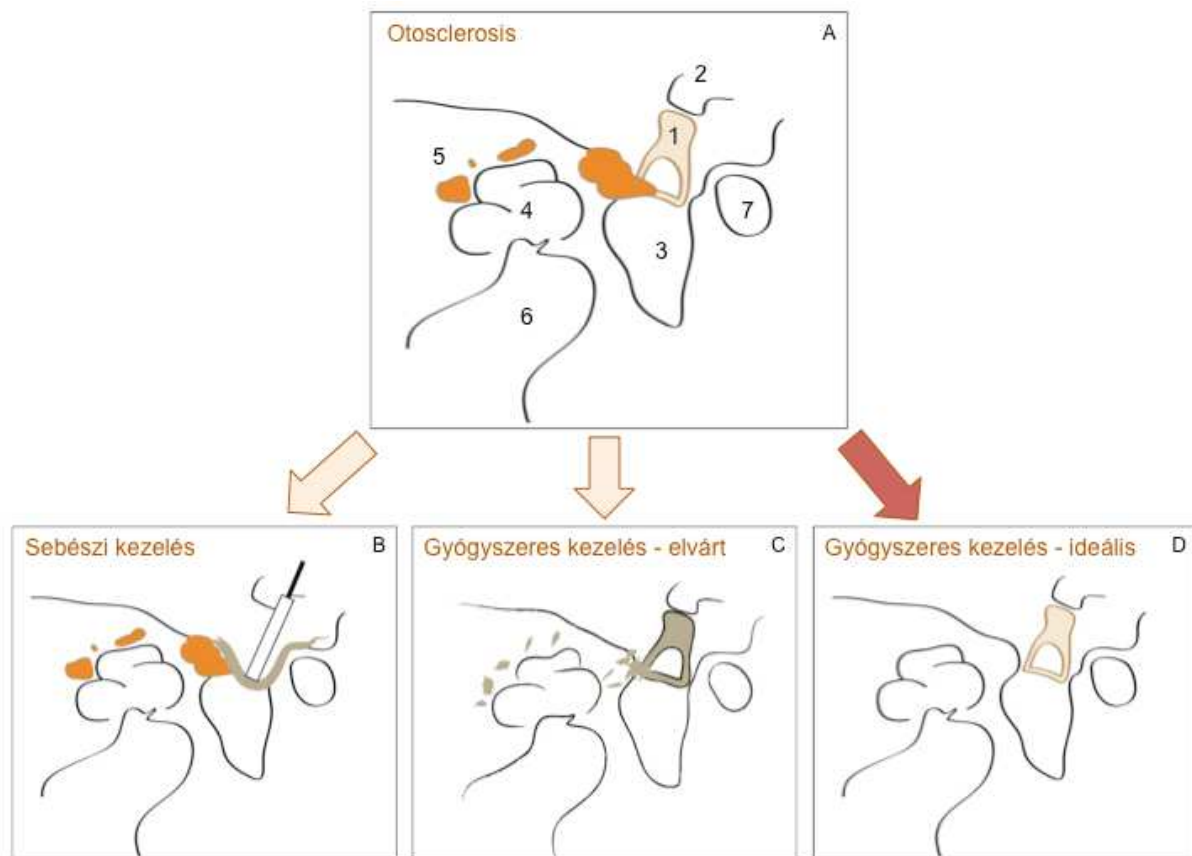
**14. ábra** Stapes sebészet (stapedectomy) intraoperatív ismertetése. Kezdetben leválasztjuk a hallójáratihelyi bőrcsövet és előemeljük a dobhártyát. Ekkor láthatóvá válik a chorda tympani, a dobüreg, a hallócsontláncolat és a fülke elülső részében elhelyezkedő otosclerotikus góc (a). Ezután eltávolítjuk a stapest (b, e), majd Schuknecht-féle tantál drót protézissel pótoljuk a láncolati hiányt (c). Az ovális ablak fülkét obliteráljuk, majd a protézist ionomer cementtel rögzítjük (d). Műtét során egészben eltávolított stapes mikroszkópos felvétele (e).

primer megoldása szükséges és második lépésben jöhet szóba stapes műtét. Amennyiben maga a probléma nem megoldható, a beteg hallókészülékkel való ellátása célravezető.

Kísérleteink során kutatócsoportunk stapedectomiát végzett és a hallócsontláncolati hiányt Schuknecht-féle tantál drót protézissel hidalta át. Ennek a beavatkozásnak a hallásnyereségen kívül a legjelentősebb előnye, hogy az egész stapes eltávolításra kerül és feldolgozhatóvá válik. Az így kinyert stapes minták képezik kísérletsorozataink bázisát (14. ábra).

### 1.7. Gyógyszeres kezelési lehetőségek

Az elsődlegesnek számító operatív módszerek mellett érdemes számba venni az esetleges farmakológiai kezelési lehetőségeket, melyek a jövőben talán megoldást jelenthetnek a szenzorineurális halláscsökkenésre, a tinnitusra és a szédülésre is<sup>2,27,39</sup> (15.



**15. ábra** Az otosclerosis aktuális terápiás lehetőségeinek sematikus áttekintése. Az otosclerosis stapediális és pericochleáris góccal (A). 1 stapes, 2 processus lenticularis, 3 vestibulum, 4 cochlea, 5 otikus kapszula, 6 meatus acusticus internus, 7 nervus facialis. Stapes sebészet – az ankylotikus stapes eltávolítása után a hallócsontláncolati hiányt protézissel helyettesítjük. A sebészi kezelés pusztán tüneti, nem befolyásolja az otosclerotikus góccokat (B). A gyógyszeres kezelés remélhetőleg az otosclerotikus fókuszokat inaktiválja (C). Az ideális nem-sebészi kezelés helyreállítja az eredeti állapotot (D).

ábra). Mindemellett az autoimmun-, gyulladásos- és csontanyagcsere szabályozási zavarok egyértelműsége miatt okvetlenül mérlegelnünk kell a korai (aktív) fázisra ható gyógyszeres támadáspontok lehetőségeit is. Jelenleg az alább ismertetett vegyületek egyike sem szerepel „evidence-based” ajánlásban, pusztán kísérletes stádiumban vannak, vagy elvi lehetőségként merülnek fel (1. Táblázat).

**1. Táblázat.** Az otosclerosis gyógyszeres kezelési lehetőségeinek áttekintése.

<i>Hatóanyag</i>	<i>Hatásmechanizmus</i>	<i>Első közlés (EBM szint)<sup>1</sup></i>
<b>Nátrium-fluorid</b>	Oszteoklaszt inaktiváció, az oszteolítikus zónák obliterációja	Shambaugh és mtsai. 1964 (5)
<b>Biszfoszfonátok</b>	Oszteoklaszt inaktiváció, az oszteolítikus zónák obliterációja	Causse és mtsai. 1982 (4)
<b>Bioflavonoidok</b>	Az oszteoklasztok anyagcseréjének gátlása	Sziklai és mtsai. 1985 (3b)
<b>D-vitamin</b>	Oszteoblaszt anyagcsere stabilizálása	Brookes 1983 (3b)
<b>A-vitamin</b>	Oszteoblaszt anyagcsere stabilizálása	Grimaldi 1956 (n.a.)
<b>Kortikoszteroidok</b>	A perivaszkuláris térben akumulálódó T-sejtek inaktivációja	Goodhill 1952 (n.a.)
<b>NSAID<sup>2</sup></b>	A ciklooxygenáz rendszer gátlása, csökkent gyulladásos mediátor felszabadulás	Huang és mtsai. 1990 (3b)
<b>Kanyaróvírus-ellenes vakcináció</b>	Kanyaróvírus-ellenes IgG termelődés	Arnold és mtsai. 2007 (2b)
<b>Rekombináns OPG<sup>3</sup></b>	Oszteoblaszt aktiváció, oszteoklaszt inaktiváció és apoptózis	Zehnder és mtsai. 2006 (3b)
<b>Anti-TNF-<math>\alpha</math> antitest<sup>4</sup></b>	A szolubilis TNF- $\alpha$ inaktivációja	Hipotézis – n.a.
<b>Anti-RANKL antitest<sup>5</sup></b>	A RANK-RANKL tengely gátlása	Hipotézis – n.a.
<b>Metothrexat</b>	Citosztatikum. T-sejt gátlás és apoptózis	Hipotézis – n.a.
<b>Leflunomid</b>	Immunomoduláns szer. T-sejt gátlás és apoptózis	Hipotézis – n.a.

<sup>1</sup>Evidencia szint: **1a:** randomizált-kontrollált tanulmányok rendszerezett áttekintése; **1b:** egyedi randomizált-kontrollált tanulmány; **2a:** kohort-vizsgálatok rendszerezett áttekintése; **2b:** egyedi kohort-vizsgálat; **2c:** kimeneti tanulmány; **3a:** eset-kontroll tanulmányok rendszerezett áttekintése; **3b:** egyedi eset-kontroll tanulmány; **4:** esetmegbeszélések; **5:** szakember által adott tapasztalati vélemény, <sup>2</sup>“Non-steroidal anti-inflammatory drug” <sup>3</sup>Osteoprotegerin <sup>4</sup>Tumor Nekrózis Faktor- $\alpha$  <sup>5</sup>“Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-b Ligand”

### 1.7.1. Csontanyagcsere ható szerek

A csontanyagcsere ható szerek közül a legterjedelmesebb irodalmi háttérrel mindmáig a *nátrium-fluorid* (NaF) rendelkezik. A különböző fluorid derivátumok a kóros csontremodelláció potens antagonistái, hatékonyan csökkentik az oszteoklaszt aktivációt és a következményes oszteolízist<sup>40,41</sup>. *Vartiainen és mtsai* tudósítottak arról, hogy a fluoridokban gazdag ivóvizet fogyasztó otosclerotikus betegek lég- és csontvezetési hallásküszöbe szignifikánsan jobbnak bizonyult, mint a csak fluoridszegény csapvízhez hozzáférőké<sup>42,43</sup>. Évekkel később ugyanez a kutatócsoport közölte az ivóvíz fluorid tartalmának függetlenségét

az otosclerosistól és az alacsony (1-3 mg) dózisú fluoridpótlás hatástalanságát<sup>44</sup>. *Bretlau és mtsai* otosclerotikus betegek NaF terápiájának hatékonyságát értékelték ki prospektív, kettős-vak, placebo-kontrollált klinikai tanulmányban. Eredményeik alapján a placebo csoport hallása szignifikánsan többet romlott, mint a napi 40 mg fluoriddal aktívan kezelték<sup>45,46</sup>. Az ellentmondásos adatok ellenére úgy tűnik, hogy a nagy dózisú (40-60 mg/nap) NaF terápia hatékony a betegség aktív stádiumában, azonban az igen komoly mellékhatások (máj-, vese-, szívelégtelenség) tükrében nem terjedt el a klinikai gyakorlatban.

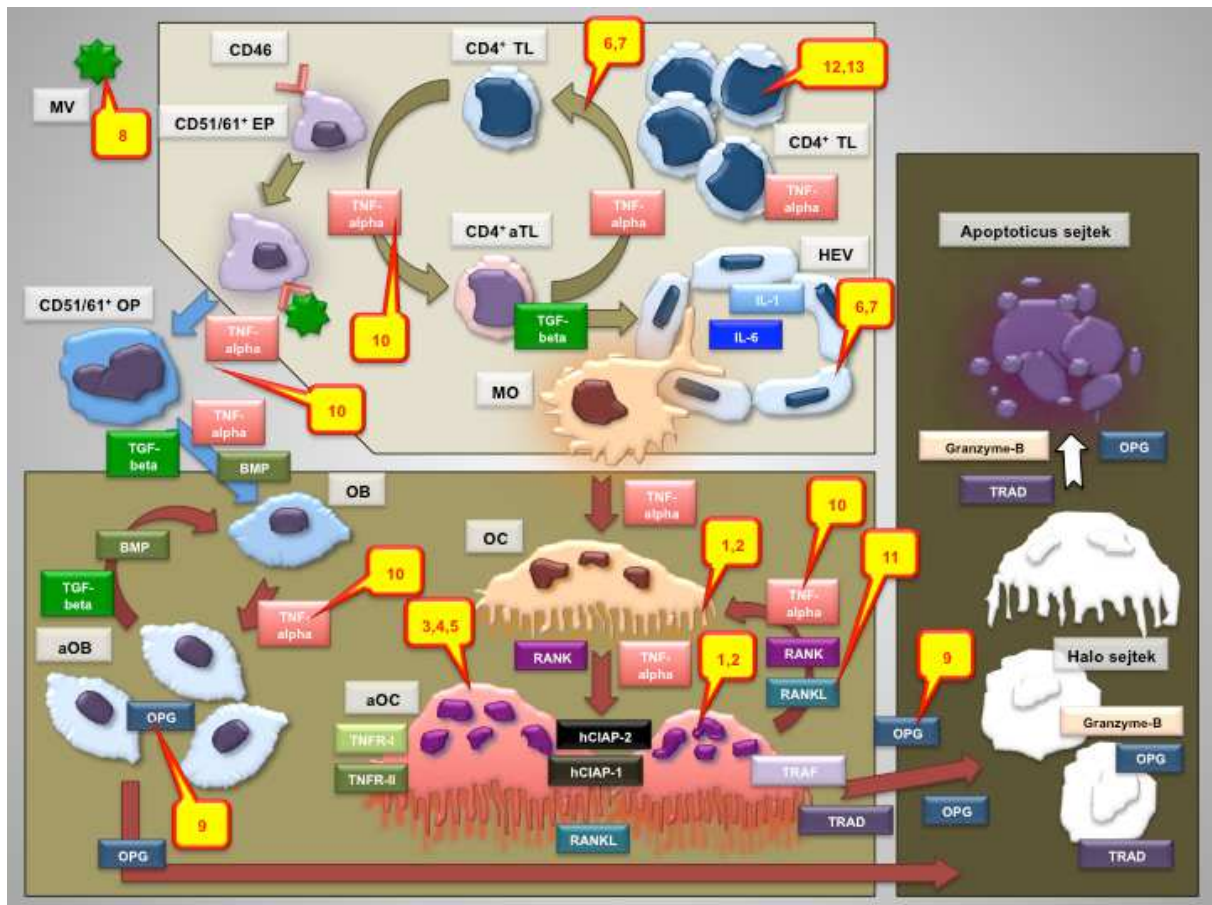
A *biszfoszfónátok* a csontlebontás során szelektíven képesek gátolni az oszteoklaszt aktivitást és a következményes csontreszorpciót<sup>17,47</sup>. Némely szerző a biszfoszfónátokat anti-oszteolítikus tulajdonságuk miatt a NaF terápia alternatívájaként javasolja fluorid intolerancia esetén<sup>30,40</sup>. Egy prospektív, kettős-vak tanulmány született az otosclerotikus progresszív halláscsökkenés Etidronát kezelésének kiértékelése céljából, mely szerint a hallás stabilizálódását és a légvezetési hallásküszöb egyértelmű javulását észlelték<sup>48</sup>. A súlyos biszfoszfónát asszociált mellékhatások szerencsére elképesztően ritkák, azonban nem lehet megfelelkezni a mandibula oszteonekrózisáról, a vese toxicitásról, a nyelvcső malignoma kialakulásáról és az akut idegi hallásvesztésről sem<sup>47,49</sup>.

A *bioflavonoidokat*, ahogy a NaF-ot és a biszfoszfónátokat, az oszteoporózis kezelésének egyik ígéretes gyógyszereként tartották számon<sup>50</sup>. Az Ipriflavone *in vitro* csökkenti a csontreszorpciót és növeli a kollagén szintézist egészséges és otosclerotikus csontkultúrákban, ezáltal elősegíti a lítikus üregek organikus mátrix-szal való kitöltődését<sup>50,51,52</sup>. *Sziklai és mtsai* egy kis elemszámú kettős-vak kísérletet bonyolítottak le, melynek 16 szubjektív tinnitusban szenvedő otosclerosisos beteg volt a főszereplője. Az alanyokat napi 4x200 mg Ipriflavone-nal vagy placeboval kezelték három hónapig preoperatíván és három hónapig stapedectomy után. A teljes hat hónapos kúra után, az Ipriflavone-nal kezelt csoport minden tagjának egyértelműen csökkent a fülzúgása, míg a placebo szedők körében csupán a résztvevők fele tapasztalt hasonlót<sup>53</sup>. Általánosságban elmondható, hogy az Ipriflavone kellőképpen biztonságos és jól tolerálható, azonban Magyarországon már nem forgalmazzák.

*Brookes és mtsai* 47 klinikailag otosclerosisban szenvedő beteg *D-vitamin* szérumszintjét vizsgálta. Az alanyok 21,7%-ában a vérplazma 25-hidroxi-D3-vitamin szintje abnormálisan alacsony értéket mutatott, valamint a betegek 33%-ánál találtak fokozott alkalikus-foszfátáz aktivitást. A rendellenesen alacsony D-vitamin szinttel rendelkező betegek

aktív D-vitamin és kalcium pótlásának hatására három betegnél szignifikáns hallásjavulást tapasztaltak<sup>54</sup>.

Az A-vitamin is befolyásolja a csontanyagcserét, mivelhogy az A-hypervitaminosis feltehetőleg oszteoklaszt-mediált módon elvékonyítja a csöves csontokat és fokozza azok fragilitását<sup>55,56</sup>. Jelenleg még csak szövettényészeteken végzett kutatások eredményei elérhetőek, azonban ezek is igen ellentmondásosak.



**16. ábra** Az otosclerotikus csontátépülési zavar patomechanizmusának áttekintése a lehetséges terápiás célpontok ábrázolásával. 1: nátrium-fluorid, 2: biszfoszfonátok, 3: bioflavonoidok, 4: D-vitamin, 5: A-vitamin, 6: kortikoszteroidok, 7: NSAID-ok, 8: kanyaró ellenes vakcináció, 9: rekombináns OPG, 10: anti-TNF- $\alpha$ , 11: anti-RANKL, 12: methotrexat, 13: leflunomid. *Rövidítések:* MV: kanyaróvírus, CD46: kanyaróvírus receptor, CD51/61: oszteoklaszt funkcionális antigén, TL: T-limfocita, aTL: aktivált T-limfocita, EP: embrionális prekursor, OP: oszteoklaszt prekursor, MO: monocita, HEV: magas endotélű venula, OB: oszteoblaszt, aOB: aktivált oszteoblaszt, OC: oszteoklaszt, aOC: aktivált oszteoklaszt.

A rekombináns humán *kalcitonin* szerepe is felmerült már az otosclerosis terápiájában<sup>27,57,58</sup>, jelentős oszteoblaszt növekedést serkentő és oszteoklaszt-dependens csontreszorpciót gátló hatása miatt<sup>58</sup>. Azonban mindmáig csak két közlemény hozzáférhető az irodalomban, az egyikben egy agresszív otosclerosisban szenvedő beteg lazac kalcitonin terápiában részesült. A szerzők hallásjavulásról és fülzúgásos panaszainak csökkenéséről

számoltak be<sup>58</sup>. Hat évvel később ugyanez a szerző 23 otosclerosisos beteget kezelt intranazális kalcitoninnal, melyre az alanyok 19,4%-a 10 dB-nél jelentősebb hallásjavulásról és 25%-a a tinnitus megszűnéséről számolt be<sup>59</sup> (16. ábra).

### 1.7.2. Gyulladáscsökkentő anyagok

Az otosclerosis korai (aktív) fázisa gyaníthatóan kanyaróvírus fertőzés által kiváltott oszteolítikus gyulladás<sup>60</sup>, ugyanakkor az otikus kapszula ellen létrejövő autoimmun reakciónak is lehet létjogosultsága a betegség patogenezisében<sup>2,36</sup>. Ezen folyamatok alapján a gyulladásgátló terápiának nem csak elvi lehetősége merül fel otosclerosis kezelésében.

A *nem-szteroid gyulladáscsökkentők* (NSAID) a ciklooxygenáz enzim gátlása révén beavatkoznak a prosztaglandinok (PG) anyagcseréjébe, ezzel befolyásolni képesek a csontreszorpciót és a csontfelépítést<sup>61,62</sup>. Az NSAID-ok tesztelését egy II-es típusú kollagén-indukált patkány otosclerosis-modellen végezték el. Az Indomethacin, még a kalcitoninnál is jobban gátolta az oszteoklasztok számának emelkedését és a csontreszorpciót<sup>57</sup>.

A *kortikoszteroidok* eredményesen csökkentik a proinflammatorikus mediátorok, citokinek és növekedési faktorok felszabadulását, ezáltal csillapodó gyulladásához vezetnek. A parenterális vagy per os alkalmazott szteroid terápia szisztémás nemkívánatos mellékhatásai miatt az intratympanális felhasználás tűnik hosszabb távon kivitelezhetőnek<sup>63</sup>. Egy tanulmány szerint öt alkalommal megismételt, 4 mg/ml-es intratympanális dexamethason injekció nem idézett elő változást a külső szőrsejtek funkciójában, melyet otoakusztikus emisszió segítségével monitoroztak<sup>64</sup>, azonban otosclerotikus betegeken ilyen jellegű kísérlet nem történt.

Az irodalomban senki sem számolt be különféle *immunszuppresszív* hatóanyagok használatáról, így a Methotrexat-ról, a Leflunomid-ről, az Azathioprin-ről és a Cyclophosphamid-ről jelenleg nincs elérhető adat. Ezidáig pusztán a Cyclosporin-A használata merült fel elvi síkon<sup>60</sup>.

### 1.7.3. Célzott (biológiai) terápiás hatóanyagok

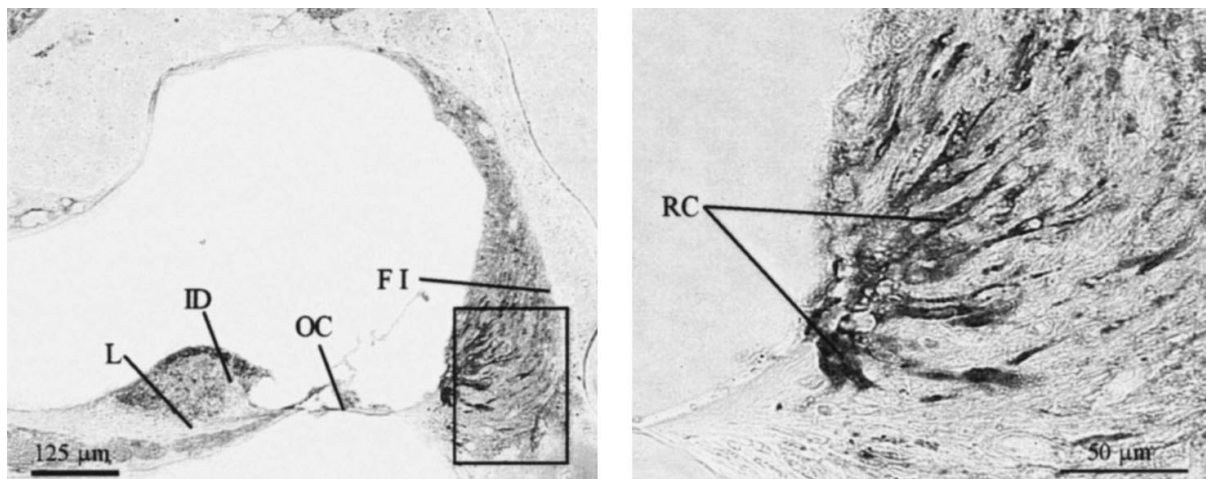
A csontreszorpció legerősebb inhibitora az OPG, mely közvetlenül gátolja az oszteoklasztogenezist, és közvetve akadályozza a TNF- $\alpha$  mediált RANK-RANKL kölcsönhatást<sup>14,15</sup>. A rekombináns humán OPG kísérletek állatokon már megindultak<sup>65</sup>, azonban az emberi felhasználás még várat magára.

A csontforgalom egyik legfőbb szabályzója a RANKL- és a DKK1-függő útvonalon keresztül ható TNF- $\alpha$ <sup>24</sup>, melyről nemrégiben bebizonyosodott, hogy otosclerosisban bőségesen termelődik<sup>16,20</sup>. Az otikus kapszulában lévő lokális TNF- $\alpha$  túlprodukciónál válthatja ki a gyulladáshoz vezető reakciót és a fokális csontreszorpciót. Elméletileg lokálisan vagy szisztémásan adagolt TNF- $\alpha$  inhibitorokkal konzervatív módon lehetne kezelni az otosclerost és az általa kiváltott szenzorineurális halláscsökkenést<sup>2</sup>. Ezidáig csak egy olyan kísérleti jellegű tanulmány jelent meg, mely intratympanális Infliximab kezelésben részesített „autoimmun belsőfül betegség” (AIED) miatt szenzorineurális halláscsökkenésben szenvedő pácienseket. Infliximab hatására négyből három esetben a tisztahang küszöbaudiometrián a beszédfrekvenciák átlaga 22,6 dB-lel javult, mely igen jelentős hallásnyereségnek számít. Ezen tanulmányban kilencből hét beteg előnyösen reagált az Infliximab kezelésre és relapszusaik száma is nagymértékben redukálódott<sup>66</sup>.

A TNF- $\alpha$ -n, B-sejteken és az OPG-n kívül a cathepsinek, RANKL, Wnt- $\beta$ -catenin, sclerostin és DKK1 is a gyógyszeres terápia lehetséges célpontjává válhat a fent leírtak szerint. Az anti-RANKL antitestet a Denosumab-ot jóváhagyták a posztmenopauzális oszteoporozis kezelésében<sup>67</sup>. A cathepsin K-gátló Odanacatib-bel is klinikai vizsgálatok folynak<sup>68</sup>.

## 1.8. Az egyedülálló otikus kapszula

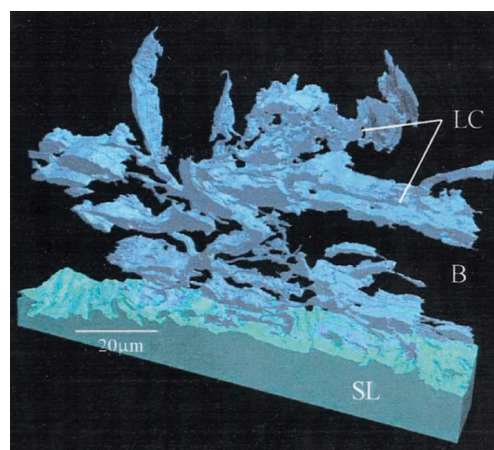
Az otikus kapszula kifejezés a hártályás labirintus körüli csontos tokot jelenti. Ez az emberi szervezet legkeményebb csontja, mely fejlődésében, morfológiájában és tulajdonságaiban is eltér a temporális csont egyéb részeitől<sup>15</sup>. Az otikus kapszula encondrális (indirekt) csontosodással jön létre a 16. gesztációs hétre, azaz a kialakult porcívásban oszteoblasztok által apró csonttelepek fejlődnek ki, melyek átalakítják és elcsontosítják a kapszulát<sup>3,69</sup>. Ez a jelenség nem jellemző a koponyatető egyéb csontjaira, melyek direkt



**18. ábra** Egér cochleában detektált OPG mRNS expresszió. Jól megfigyelhető a jelentős mennyiségű OPG a cochlea lágy szöveteiben, különösképpen az interdentális sejtekben és a stria vascularis területén. *Rövidítések:* RC: stria vascularisban lévő gyökér sejtek, L: limbus, ID: interdentális sejtek, OC: Corti-féle szerv, FI: I-es típusú fibrocita. *Zehnder és mtsai.*

csontosodással képződnek, vagyis a kötőszöveti alapállomány porctelepek fejlődése nélkül közvetlenül elcsontosodik. Az otikus kapszula alakulása az első életév végére teljesen befejeződik, majd az élet előrehaladtával a csontforgalom szinte teljesen leáll, az oszteoblasztok és oszteoklasztok aktivitása nullához közelít<sup>69</sup>. Magyarázatul szolgálhat, hogy az alacsony csontanyagcsere az egész életen át próbálja védeni a hártyás labirintust és a Corti-féle szervet a biomechanikai változásoktól, ezzel biztosítva egy állandó környezetet a halló- és egyensúlyozó rendszer perifériás végkészülékének<sup>3</sup>. Érdekes jelenség, hogy a koponyaalap speciális, az otikus kapszulát is érintő törései után, az alacsony csontremodelláció miatt csontos kallusz soha nem képződik, pusztán kötőszövetes regeneráció következik be<sup>15,70</sup>.

Az otikus kapszula különlegességeinek alapja feltehetőleg az OPG és az otikus kapszula falában elhelyezkedő „lakunokanalikuláris” rendszer. Ahogy korábban már említésre került, a cochlea lágy szöveteiben jelentős mennyiségű OPG mRNS szintet mértek, majd az otikus kapszula felé exponenciálisan csökkent a detektálható OPG mennyisége és a csontban nem volt kimutatható OPG expresszió (17. ábra). Következésképpen azt feltételezzük, hogy cochlea saját integritásának megőrzése céljából termel OPG-t és szekretálja a perilymphába, hogy az otikus kapszula lakunokanalikuláris rendszerén

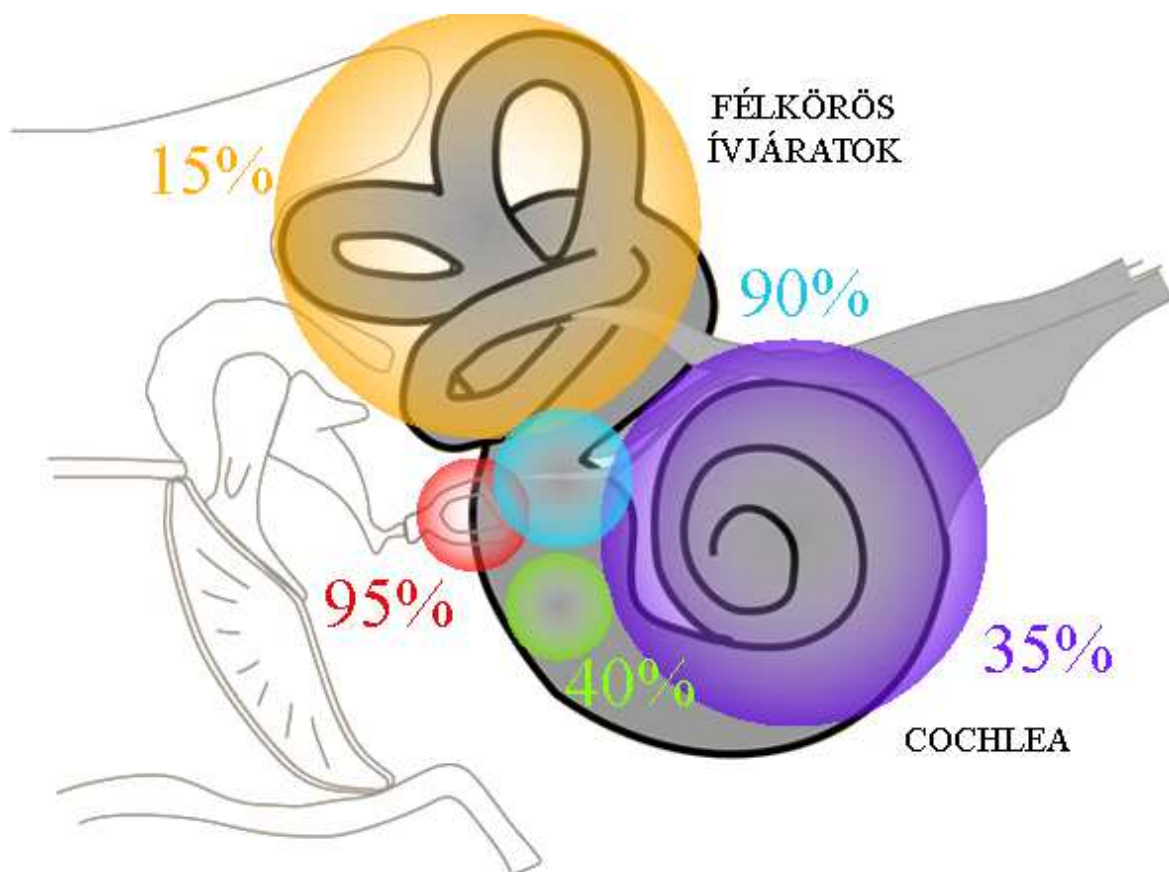


**17. ábra** Az otikus kapszula szerteágazó lakunokanalikuláris rendszerének 3D-s rekonstrukciója. SL ligamentum spirale, LC lakunokanalikuláris rendszer, B csont. *Zehnder és mtsai.*

keresztül diffundálva eljusson a csontszövethez és szinte teljesen megállítsa annak anyagcseréjét<sup>15</sup> (18. ábra). Ezzel a frappáns megoldással biztosítja a cochlea saját biomechanikai stabilitását mely elengedhetetlen alapfeltétele a hangfeldolgozás állandóságának.

Az otikus kapszula alapvetően három eltérő csontszerű rétegből áll. Belül, közvetlenül a perilymphával határosan az *endoszteális* réteg helyezkedik el, míg kívül a *perioszteális* réteg található. Középen a *globuli interossei* foglal helyet, ami olyan embrionális csontmaradvány, mely egész életen át perzisztáló embrionális kondrocitákat tartalmaz<sup>71</sup>. Ezen embrionális maradványokról joggal feltételezhető, hogy a későbbi otosclerotikus gócok kiindulási helyei (embrionális kondrocita reaktiváció hipotézise) lehetnek<sup>71</sup>. Mindamellet ezek a sejtek eltűnnek az otosclerotikus fókuszokból és aktív oszteoklasztokkal cserélődnek ki. A betegségmentes felnőtt otikus kapszulával szemben az otosclerotikus góc oszteoklasztjai és oszteoblasztjai egy speciális embrionális glikoproteint, a CD51/61-et (oszteoklaszt funkcionális antigén) expresszálják, melyet kutatócsoportunk írt le<sup>71</sup>. Ráadásul a fokozott BMP, TGF- $\beta$  és TNF- $\alpha$  expresszió is alátámasztja az embrionális kondrocita reaktiváció hipotézisét az otosclerosis patogenezisében. Korábbi tanulmányok szerint a kondroblasztok és az oszteoblasztok reaktiválódhatnak és oszteoklasztokká alakulhatnak például a kanyaróvírus fertőzés által előidézett gyulladásos reakciónak köszönhetően<sup>3,71</sup>.

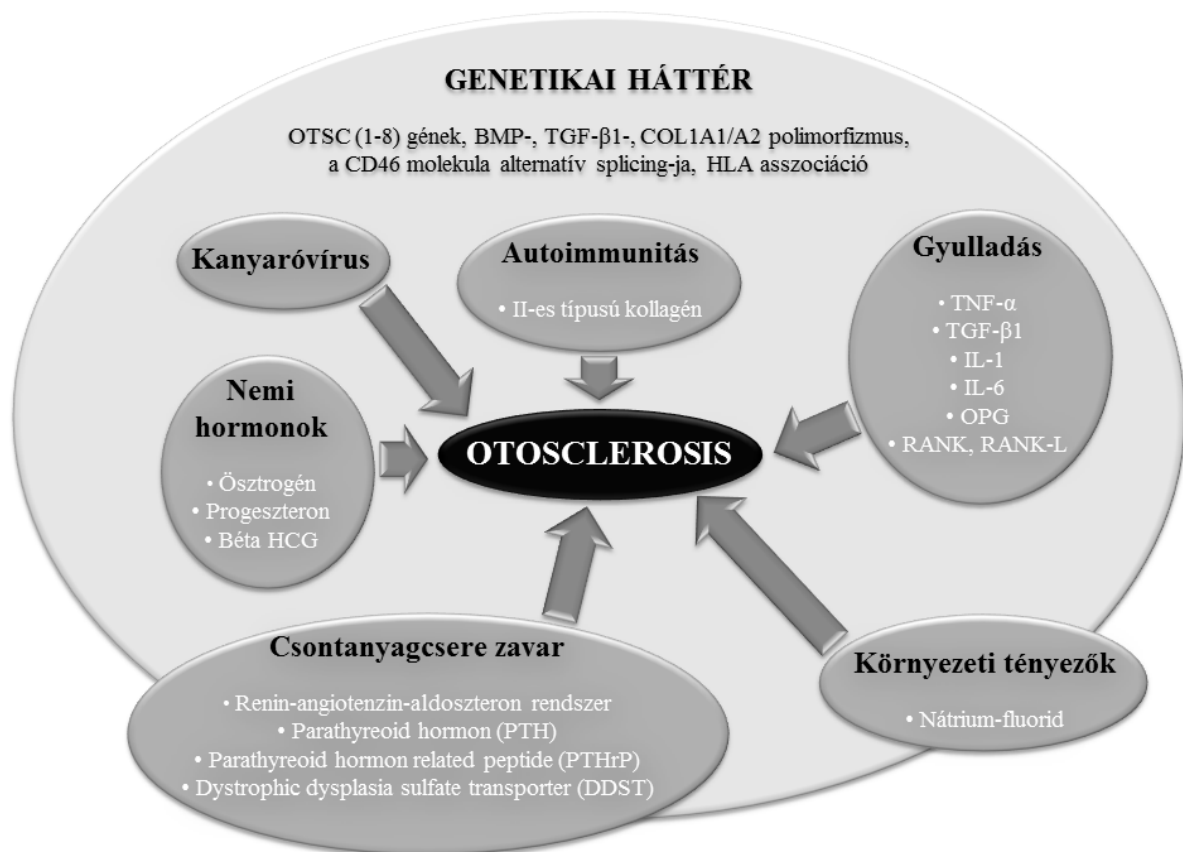
Anatómiai és funkcionális szempontok alapján a stapes egy önálló egység, azonban meglepő módon két külön telepből fejlődik. A szuperstruktúra a Reichert-féle porcból származik, ami a II. vagy „hyoid” garatív része, ugyanakkor a stapes talpa érdekes módon az otikus kapszula mezodermális részéből alakul ki. Ez az észrevétel a magyarázata annak a ténynek, miszerint kizárólag a stapes talpban alakulhat ki otosclerotikus góc, a stapes egyéb részeiben sohasem<sup>36</sup>. Okvetlenül megemlítendő a fibrózus szövetet és éretlen porcot tartalmazó *fissula ante fenestram*, mely preformált topológiai régióként predilekciós helye mind a stapediális, mind a cochlearis otosclerosisnak<sup>3</sup>. A *fissula ante fenestram* a *m. tensor tympani* inának laterál felé kanyarodásánál, mindjárt az ovális ablaktól előre és a processus cochleariformistól hátrafelé helyezkedik el. Leggyakrabban az előbb említett anatómiai régióban fordul elő otosclerotikus góc, azonban autopsziás vizsgálatok szerint létrejöhetnek gócok pericochlearisan (35%), perilabirinter (15%), a stapes talpban (95%), az ovális ablakban (90%) és a kerekablak fülke (40%) szomszédságában<sup>1</sup> (19. ábra).



**19. ábra** Az otosclerotikus fókuszok predilekciós helyeinek előfordulási gyakorisága az otikus kapszulában.

## 2. PATOGENEZIS

Az otosclerosis egy ismeretlen etiológiájú komplex megbetegedés, melyet genetikai és környezeti faktorok szofisztikált összjátéka vált ki (20. ábra). Az elmúlt évtizedekben számos próbálkozás történt további etiológiai tényezők azonosítására, hogy feltérképezhetővé váljon a betegség patomechanizmusa<sup>38</sup>. Jelen fejezetben az otosclerosisral összefüggésbe hozott patogenetikai tényezőket ismertetjük.



20. ábra Az otosclerosis etiopatogenetikai tényezőinek sémás ábrázolása.

### 2.1. Genetika

Otosclerosisban szenvedő betegek családi halmozódása már régóta elfogottnak számít. A betegség genetikai determinációjának legimpozánsabb bizonyítékát klinikai otosclerosisos monozigóta ikrek szolgáltatják, akiknél a konkordancia szinte minden esetben megfigyelhető<sup>72</sup>. Számos öröklődési módot indítványoztak már<sup>12</sup>, azonban manapság az otosclerosist egyetemesen autoszómális dominánsan öröklődő betegségnek tartják 40-45%-os

inkomplett penetranciával<sup>2,31</sup>. Az inkomplett penetrancia jelensége a betegek egy részénél a betegség-asszociált genotípus mellett nem manifesztálódó jelleget jelenti<sup>12</sup>. Az esetek nagyjából felében a betegség előfordulása sporadikus módon, azaz pozitív családi anamnézis nélkül jelentkezik<sup>12</sup>.

Több stratégia létezik a különféle betegségek genetikai hátterének felderítésére. A kapcsoltsági tanulmányok a betegséget okozó gén azonosítása érdekében hatalmas, több generációs családokat tesznek górcső alá és analizálják azok genetikai állományát. Ezzel szemben az asszociáción alapuló tanulmányok egy heterogén populációban keresik a kapcsolatot bizonyos gének és a kismemelt betegség között.

**2. Táblázat.** Az otosclerosissal összefüggésbe hozható lókuszek.

<i>Lókuszt</i>	<i>Származási ország</i>	<i>Első közlés</i>
OTSC1 (15q25-q26)	India	Tomek és mtsai. 1998
OTSC2 (7q34-q36)	Belgium	Van Den Bogaert és mtsai. 2001
OTSC3 (6p22.3-p21.2)	Ciprus	Chen és mtsai. 2007
OTSC4 (16q21-q23.2)	Izrael	Brownstein és mtsai. 2006
OTSC5 (3q22-q24)	Dánia	Van Den Bogaert és mtsai. 2001
OTSC6 (feltételezett)	n.a.	n.a.
OTSC7 (6q13-q16.1)	Görögország	Thys és mtsai. 2007
OTSC8 (9p13.1-9q21.11)	Tunézia	Bel Hadj Ali és mtsai. 2008
OTSC9 (feltételezett)	n.a.	n.a.
OTSC10 (1q41-q44)	Dánia	Schrauwen és mtsai. 2011

### 2.1.1. Kapcsoltsági tanulmányok (linkage study)

Kapcsoltsági tanulmányokat használnak a betegségek Mendeli szegregációért felelős genetikai faktorainak azonosításához. Hatalmas otosclerosisos családok esetén néhány száz vagy néhány ezer genetikai markert analizálnak, hogy meghatározhassák, melyik kromoszóma régióban található a betegség kialakulásáért felelős gén. Ezután a felfedezett kromoszóma régió belül hosszantartó és aprólékos munkával azonosítják a betegségért felelős gént<sup>38</sup>. Napjainkig, a genetikai kapcsoltsági tanulmányok összesen tíz különböző otosclerosissal összefüggésben álló lókuszt (OTSC1-10) létezését demonstrálták<sup>73</sup> (2. Táblázat). Annak ellenére, hogy ezeket a lókuszeket feltérképezték, sem kiváltó gént, sem fehérje terméket nem sikerült idáig azonosítani<sup>4</sup>. Ugyanakkor képtelenek voltak összefüggést kimutatni kapcsoltsági tanulmányok segítségével az otosclerosis és az AB0, MN, Rh

vércsoportok és a különféle haptoglobin genotípusok között<sup>72</sup>.

### 2.1.2. Asszociáció alapuló tanulmányok (association study)

Az otosclerosis és az MHC I (major histocompatibility complex) molekula között is felmerült a kapcsolat, ahogy számos autoimmunak tartott betegség esetében is. Noha az MHC I antigének egyik osztályának sem tudták emelkedett prevalenciáját kimutatni, a HLA-B40 előfordulási gyakorisága szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult otosclerosisos betegekben, mint egészséges donorokban<sup>2</sup>. A HLA rendszer fehérje antigéneket prezentál a T-sejteknek, így kimagaslóan fontos szerepet játszik az immunrendszer működésében<sup>38</sup>.

Az otosclerosis *kollagén*-hipotézise szerint az I-es típusú kollagén A1 és A2 alléljeinek (COL1A1 és COL1A2) promóter régiójában bekövetkező mutációk vagy SNP-k („single nucleotide polymorphism”) állhatnak a betegség hátterében. A kollagén molekula egy evolúcionálisan meglehetősen változatlan, fibrillum-képző molekula, mely két  $\alpha$ -1 és egy  $\alpha$ -2 láncból álló „hármashélixet” alkot<sup>74</sup>. Elsőként *McKenna és mtsai* találtak összefüggést klinikai otosclerosisos páciensek és a COL1A1 mutációi között, melyből feltételezésük szerint az otosclerosis esetleg oszteogenezis imperfecta vagy oszteoporózis lokalizált manifesztációja lenne<sup>75</sup>. A későbbiek során ugyanez a kutatócsoport ugyancsak klinikai otosclerosisban szenvedő betegek bőréből származó fibroblaszt sejtkultúrákon tanulmányozta a COL1A1 mRNS expresszió mértékét. Az oszteogenezis imperfektával ellentétben, az alanyok igen kis hányadában detektáltak alacsonyabb allél expressziót<sup>76</sup>. Más vizsgálatokban a COL1A1 allél első intronjának Sp1 része hasonlóságot mutatott az oszteoporózisban találtakhoz<sup>77</sup>. Az eddigiekkel szöges ellentétben *Rodriguez és mtsai* nem tudták megerősíteni a COL1A1 és COL1A2 szerepét az otosclerosis etiopatogenezisében<sup>113</sup>. Végül *Chen és mtsai* azonosítottak protektív és hajlamosító COL1A1 gén haplotípusokat, amelyek kaukázusi fehér populációban szignifikáns módon összefüggést mutattak az otosclerosisissal<sup>97</sup>.

A *TGF- $\beta$ 1* egy univerzálisan elterjedt citokin, amely szerepet játszik különböző gyulladásos betegségekben és esetlegesen az otosclerosis patogenezisében is<sup>70</sup>. Nagy beteganyagot felölelő belga, holland és francia populációk analízise alapján a TGF- $\beta$ 1 gén T263I SNP-je statisztikailag szignifikáns összefüggésben áll az otosclerosisissal<sup>31</sup>. Az újonnan ismertett variáns a 263. aminosavban különbözik a TGF- $\beta$ 1 fehérjétől<sup>38</sup>. *Thys és mtsai* eredményei szerint a TGF- $\beta$ 1 I263 variánsa biológiailag aktívabb a T263 allénnél, és eme

variáns protektív természetű az otosclerosis manifesztációjával szemben<sup>96</sup>. Elképzelhető, hogy gátolja az oszteoklasztokat és megakadályozza a betegség korai fázisában jellemző csontreszorpciót. A fent említett populációkban a TGF- $\beta$ 1 DNS szekvencia analízise három ritka nem-szinoním mutációt (E29, A29, I241) tárt fel, melyek befolyásolhatják a TGF- $\beta$ 1 funkcióját és aktivitását. Az elsőt, a G29E variánst két belga-holland otosclerosisos betegen detektálták, mely megváltoztatja a szignál peptid hasítási helyét és hosszabb pre-TGF- $\beta$ 1 molekulát eredményez. A másodikat, a G29A variánst egy francia páciensben mutatták ki és annak ellenére, hogy ez a csere nem változtatja meg a hasítás helyét, potenciálisan eliminálja az *N-myristoláció* helyét. Az utolsó ritka variáns egy belga-holland alanyánál felfedezett T241I variáció, mely megváltoztathatja a foszforilláció, vagy az amidáció helyét<sup>31</sup>. Ezek az észrevételek azt sugallják, hogy a TGF- $\beta$ 1 különféle ritka variánsai hozzájárulhatnak az otosclerosis szembeli fokozott fogékonysághoz.

Az „embrionális porc reaktiválódásának” hipotézise szerint az emelkedett *BMP* aktivitás szintén szerepet játszhat az otosclerosis patogenezisében. A TGF- $\beta$  szupercsaládba tartozó *BMP*-k növekedési faktorok, melyek részt vesznek az enkondrális csontosodásban, az új csontfelépítésben és helyreállító mechanizmusokban<sup>3</sup>. *Lehnerdt és mtsai* otosclerotikus stapes talpakban immunhisztokémiai vizsgálatokkal szignifikánsan magasabb *BMP* 2, 4 és 7 expressziót detektáltak. Továbbá azt is megfigyelték, hogy az előbbieken említett *BMP*-k hatása a *BMPR-1B*-n és *BMPR-2*-n keresztül közvetítődik<sup>78</sup>. A későbbiek során *Schrauwen és mtsai* nem meglepő módon szignifikáns összefüggést találtak klinikai otosclerosis és *BMP* 2 és 4 expresszió között. Két otosclerosis-asszociált SNP-ről számoltak be a *BMP* 2 és 4 génjeiben, melyből a *BMP* izoformák lehetséges kockázattövelő szerepére hívták fel a figyelmet<sup>28</sup>. Az első nem-kódoló SNP rs3178250 (*BMP2*) a 3' nem-kódoló régióban helyezkedik el, míg a második rs17563 (*BMP4*) aminosav cseréhez vezet a *BMP4*-ben, mely szorosán korrelál az otosclerosis előfordulásával<sup>28</sup>. Racionális módon érthető, hogy a csontképződésnek a *BMP*-k és a TGF- $\beta$  is kulcs regulátorai, ráadásul a *BMP* és a TGF- $\beta$  útvonalakban számos összefonódás figyelhető meg, melyek néhol ellentétes kölcsönhatásokat eredményeznek a két fehérje csoport között<sup>79,80</sup>.

A *RELN* gén és annak polimorfizmusai is szóba kerültek az otosclerosis genetikai hátterével kapcsolatban<sup>31</sup>. A *RELN* gén egyetlen extrém nagyméretű extracelluláris mátrixfehérjét kódol, melyet reelin-ként aposztrofálnak. A reelin egy speciális „decoy” receptor, mely szinte kizárólag neuronális elemekben fordul elő és az emberi agy fejlődése

során sok más egyéb mediátorokkal együtt szabályozza az idegsejtek migrációját és a szinapszisképződést<sup>81</sup>. *Van Camp* hívta fel először a figyelmet a RELN SNP-inek lehetséges szerepére az otosclerosis etiológiájában, majd *Schrauwen és mtsai* teljes genomot lefedő asszociációs tanulmányt végeztek, amelyben 550000 SNP-t vizsgáltak a klinikai otosclerosisral összefüggésben. Eredményeik alapján két otosclerosisral szorosan asszociált SNP-ről számoltak be, majd érdekes módon igazolták a RELN mRNS jelenlétét és a reelin fehérje expressziót a belsőfülben és az egészséges emberi stapes talpban is<sup>82</sup>. Ezt követően több szerző klinikailag otosclerotikus beteganyagot vizsgálva összefüggést mutatott ki az otosclerosis és a RELN SNP-k allélheterogenitása között. Kutatócsoportunk szövettanilag igazolt stapes talpak analízise során RELN-specifikus mRNS-t nem tudott RT-PCR-rel kimutatni, azonban immunfluoreszcens próbával minimális reelin fehérje expressziót detektáltunk. Meglátásunk szerint a reelin fehérje embrionális fejlődésben játszott szinapszis képző szerepe miatt lehet jelen a neuronális elemekkel körülvevő otikus kapszulában, azonban aktív mRNS átírás nem történik<sup>81</sup>.

Újabban a *renin-angiotenzin-aldoszteron rendszert* (RAAS) is belekeverik az otosclerosis patogenezisébe. A RAAS elsősorban a vérnyomás szabályzásban és a volumen háztartásban játszik nélkülözhetetlen szerepet, azonban kimutatták, hogy az angiotenzin II elősegíti a TNF- $\alpha$  expressziót, és ezúton kapcsolta össze az aktív otosclerosisban megjelenő TNF- $\alpha$  túlprodukciónal. Több gén polimorfizmusát tárták napvilágra (AGT M235T-t, ACE-I/D-t és AT-IR A/C1166), melyek összefüggésbe hozhatóak a betegséggel. Kezdetben ellentmondásos információk láttak napvilágot, így kutatócsoportunk szövettanilag megerősített stapes talpakon végzett kísérleteket, melyeket a későbbi kísérletsorozatok kapcsán részletesen tárgyalunk<sup>83</sup>.

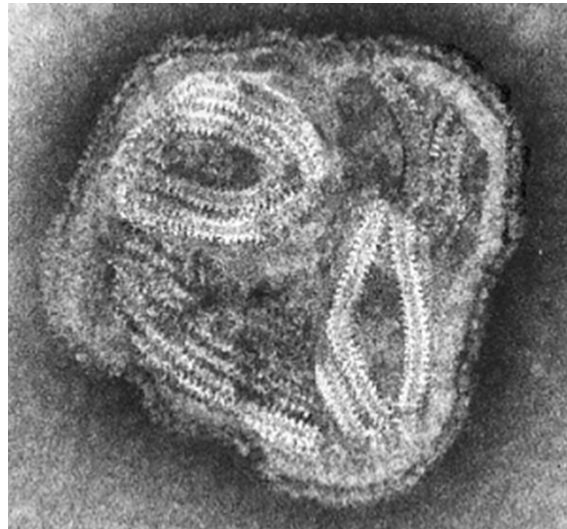
## 2.2. Kanyaróvírus és receptorai

Az utóbbi évtizedekben komoly figyelem fordult az otosclerosis virális eredete felé, miszerint különböző vírusok (kanyaró, mumpsz, rubeola, herpesz szimplex vírus 1) szerepet játszhatnak a betegség patogenezisében. Manapság egyre inkább úgy tűnik, hogy az otosclerosis egy perzisztáló *kanyaróvírus* fertőzés következménye<sup>2</sup>. A kanyaróvírus egy Paramyxovírus családba tartozó RNS vírus, melynek örökítőanyaga negatív egyszálú RNS. Neuraminidáza nincs, azonban tartalmaz a scyntitium képzésben résztvevő fúziós fehérjét,

valamint haemagglutinit és haemolizint. Nukleoprotein és mátrix protein szükséges a virális RNS stabilizációjához és replikációjához<sup>70</sup> (21. ábra).

1986-ban *McKenna és mtsai* elektronmikroszkóppal analizáltak otosclerotikus szövetmintákat, mely során Paramyxovírus nukleokapszidra emlékeztető pleomorf filamentózus struktúrákat azonosítottak oszteoblaszt sejtekben<sup>114</sup>. Egy évvel később aktív otosclerotikus gócban nagy koncentrációban figyeltek meg IgG antitesteket, szemben a normális csontot tartalmazó stapes mintákkal, ahol az IgG antitestek és vírus antigének hiányoztak<sup>12</sup>. Érdekes módon alacsonyabb kanyaróvírus-ellenes IgG szinteket észleltek az otosclerotikus betegek szérumában, mint az egészséges kontrollokban. Jelen megfigyelés előnyös lehet a preoperatív diagnózis felállításában<sup>85</sup>. Egy évtizeddel később kutatócsoportunk figyelemre méltó mennyiségű otosclerotikus stapes talp segítségével igazolta kanyaróvírus egyértelmű jelenlétét és azonosította CD46 (kanyaróvírus humán sejteken előforduló receptora), CD51/61 (oszteoklaszt funkcionális antigén), TNF- $\alpha$  és osteoprotegerin jelenlétét<sup>12</sup>. Egy nemrég megjelent közlemény a kanyaróvírus és az otosclerosis között direkt ok-okozati összefüggést elemezte, miszerint az kanyaróvírussal szemben vakcinált populációban alacsonyabb az otosclerosis incidenciája, mint a nem átoltott populációban<sup>86</sup>.

Korábban már említésre került, hogy a CD46 molekula a kanyaróvírus humán celluláris receptora, amelyet membrán kofaktor proteinnek (MCP) is neveznek. A CD46 kofaktor aktivitása során a C3b és C4b komplement komponensek inaktiválásával védi a gazdaszervezetet a komplement rendszer okozta károsodásuktól<sup>85</sup>. A CD46 mRNS egyetlen génről íródik át, mely poszt-transzlációs módosuláson megy át alternatív splicing (mRNS poszt-transzlációs módosulása, melynek lényege, hogy egy adott génről átíródott mRNS számos fehérjét kódolhat, melyek keletkezése akár egy időben is történhet) során. Utóbbi jelenség megdöntötte az „egy gén egy fehérje” hipotézist. A CD46 az összes humán sejt



**21. ábra** A kanyaróvírus transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) szerkezete. Megfigyelhető a jellegzetes gömbölyded forma, valamint a negatív egyszálú RNS genom (-ssRNS) striált, feltekeredett állapota. <http://dvm5.blogspot.hu/2010/11/introduction-history-of-viruses.html>

felszínén manifesztálódó I. típusú transzmembrán glikoprotein, melynek eddig összesen tizennégy alternatív splicing variánsa ismert<sup>87,88</sup>. Kutatócsoportunk korábbi kísérletei során szignifikánsan emelkedett CD46 expressziót detektált immunfluoreszcens vizsgálattal otosclerotikus stapes talpakban. Ráadásul négy új CD46 alternatív splicing variánst sikerült kimutatnunk otosclerosisos stapes talpaktól, melyeket *os1*, *os2*, *os3* és *os4*-nek neveztünk. Az egyes variánsok izoformáit fehérje-szinten is sikerült azonosítanunk. Jelen izoformák rövidebb vagy hiányzó transzmembrán domain-nel rendelkeznek és egy egészen ritka citoplazmatikus farokkal, amelyhez megváltozott jelátvitel társul. Emellett a kanyaróvírus kötő képességük változatlan. Következésképpen az otosclerosis specifikus CD46 izoformák és azok megváltozott funkciói szolgálhatnak magyarázatul az otosclerosis organotropizmusára, a vírus-asszociált etiológiára és az autoimmun-gyulladásos patogenezisre<sup>87,88</sup>.

### 2.3. Környezeti tényezők

Jelen fejezetben a környezeti hatásokat röviden tárgyaljuk, kizárólag a dolgozat logikai váza miatt, azonban ezekről a vegyületekről már részletesen beszámoltunk a „Gyógyszeres kezelési lehetőségek” részben. A különféle *fluorid* derivátumok a kóros csontátépülés potens antagonistái, azaz deprimálják az oszteoklaszt aktivációt és a következményes oszteolízist<sup>40</sup>. Oszteoporózisban a fluorid feltartóztatja a csontfogyást és stabilizálja a Paget-kór progresszióját anélkül, hogy befolyásolná a csonttörések incidenciáját<sup>70</sup>.

Az emberi szervezetben a *D*- és az *A*-vitamin szintek is befolyásolják a csontanyagcserét, ezáltal befolyásolhatják az otosclerosis kialakulását és patogenetikai tényezőnek számíthatnak<sup>54,55</sup>.

### 2.4. Hormonális hatások

A *nemi hormonok* szerepét több tényező is alátámaszthatja az otosclerosis patogenezisében. Elsőként hangsúlyozandó, hogy epidemiológiai adatok szerint 2-3-szor annyi nő szenved otosclerosisban, mint férfi. Mindemellett azt a régóta érvényben lévő észrevételt sem szabad elfelejteni, hogy a betegség tünetei gyakorta látványosan romlanak különféle hormonális változásokra (terhesség, laktáció, abortusz, menopauza, antikonceptívusok).

használat)<sup>12</sup>. Ebből az is következik, hogy az ösztrogén-progeszteron-prolaktin rendszer eltérései közreműködhetnek az otosclerosis kialakulásában és progressziójában<sup>70</sup>. Az ösztrogén csökkenti az oszteoklasztok aktivitását és indukálja azok apoptózisát. Továbbá a prolaktin felszabadulás hatékony stimulátorai az ösztrogének és a progesztagének, melyek túltermelődése kapcsán a csontok ásványi anyag tartalmának csökkenésével jellemezhető hiperprolaktinémia jön létre<sup>89</sup>. Kísérletes tanulmányok szerint a RANKL termelést a prolaktin csökkenti, míg az OPG fokozza. Mindemellett a hiperprolaktinémia összefügg a terhességgel és a tejelválasztással, mely alapjául szolgálhat az otosclerosis fokozott kockázatának ikerterhességben<sup>89</sup>. Ezenfelül az ösztrogén-indukált hiperprolaktinémia az OPG védő szerepének gátlásával ellenállhat az ösztrogén hatásának. Ez lehet a magyarázat arra, hogy az orális fogamzásgátlók alkalmazása és a hormonpótló kezelések miatt növelhetik az otosclerosis manifesztációjának rizikóját<sup>89</sup>.

A *renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer* (RAAS) etiológiai szerepe is felmerült az otosclerosis patogenezisében, miszerint az angiotenzin II elősegíti a TNF- $\alpha$  fokozott expresszióját, ami valójában aktív otosclerosisban is megfigyelhető<sup>83,90</sup>. A kezdeti ellentmondásos vizsgálatok ellenére, napjainkban egyre inkább megdőlni látszik a RAAS és az otosclerosis közötti kapcsolat<sup>83,91</sup>. A későbbiekben audiológiailag utánkövetett prospektív tanulmányok szükségesek otosclerosisban és egyben magasvérnyomás-betegségben is szenvedő páciensekkel, akik ACE-gátlókkal vagy AT-receptor blokkolókkal lennének ellátva, hogy megállapíthassuk a RAAS blokkolásának hatásait otosclerosisban<sup>83</sup>.

A *parathormon* (PTH) elsődleges feladata a csontreszorpció és a generalizált oszteolízis létrehozása, miközben antagonizálja a D-vitamin és a kalcitonin balanszírozó hatását<sup>70</sup>. *Fano és mtsai* otosclerosisos sejtkultúrákban szignifikánsan alacsonyabb PTH expressziót mutattak ki a kontrollokhöz képest D3-vitamin stimulációra. Következésképpen a PTH-ra adott abnormális sejtválasz hozzájárulhat az otosclerosisban előforduló patológiás csontremodellációhoz a receptorok deszenzibilizációja vagy a csökkent receptor expresszió által<sup>92</sup>. Ugyanezen logika alapján az ellenkező hatást kiváltó *kalcitonin* is potenciális szerepet játszhat az otosclerosis patogenezisében.

A „*dystrophic dysplasia*” *szulfát transzporter* (DDST) a szulfát adszorpcióban és readszorpcióban játszik szerepet a csontátépülés szabályzása során<sup>70</sup>. *Grayeli és mtsai* fokozott DDST aktivitást detektáltak otosclerosisban, azonban otosclerosisos szövettényészetekben az mRNS expressziós ráta normálisnak bizonyult. Mindemellett a

DDST aktivitás jelentős korrelációt mutat az otosclerosisban előforduló szenzorineurális halláscsökkenés súlyosságával<sup>93</sup>.

## 2.5. Autoimmunitás - oszteoimmunológia

Az otikus kapszula ellen létrejött autoimmun reakció is felmerült az etiológiai tényezők sorában, azonban mindmáig igen ellentmondásos eredmények állnak rendelkezésünkre<sup>70</sup>. Elképzelhető, hogy az otikus kapszula *globuli interossei* rétegében megbújó embrionális porcmaradványokban előforduló II-es típusú kollagén ellen létrejött autoimmun reakció játszik meghatározó szerepet az otosclerosis kifejlődésében<sup>38</sup>. *Yoo és mtsai* II-es típusú kollagén elleni autoantitesteket mutattak ki otosclerosisos betegek szérum mintáiból<sup>94</sup>. Ezt követően többen próbálták alátámasztani eredményeiket sikertelenül<sup>70</sup>. A későbbiek során megerősítést nyert, hogy az autoantitestek koncentrációja csak az előrehaladott betegségben szenvedők szérumában emelkedik meg. Végül több kutatócsoportnak is sikerült otosclerosisos betegek szérumából fokozott II-es és IX-es típusú kollagén ellen termelt autoantitesteket detektálni, egészséges kontrollokkal ellentétben<sup>70</sup>. Továbbá a betegek szérumában talált össz antinukleáris antitest (ANA) koncentráció jól korrelált a szenzorineurális halláscsökkenés súlyosságával<sup>38</sup>. Ugyanakkor, patkányokban előidézett II-es típusú kollagénspecifikus autoimmun reakció az otikus kapszulában otosclerosisra kimondottan emlékeztető lítikus csontléziókat hoz létre, így az utóbbi kísérlet bizonyos keretek között megfeleltethető lehet az otosclerosis állatmodelljének<sup>94</sup>. Sajnálatos módon ez utóbbi vizsgálat eredményét egyetlen kutatócsoport sem tudta reprodukálni<sup>70</sup>.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Otosclerotikus stapes talpaktól immunfluoreszcens vizsgálattal a COL1A1 és COL1A2 által kódolt  $\alpha$ -1 és  $\alpha$ -2 láncok expressziós szintjének és mintázatának feltérképezése.

Ankylotikus stapes talpaktól RT-PCR vizsgálat segítségével COL1A1 és COL1A2 allél-specifikus mRNS kimutatás. Patológiás transzkripciós variánsok esetén azok meghatározása.

Otosclerotikus gócot tartalmazó stapes talpakban BMP 2-, 4-, 5- és 7-specifikus immunfluoreszcens próbával a fehérje expresszió kimutatása. Az eredmények összevetése az otosclerosis szövettani stádiumával és klinikai aktivitásával.

Otosclerotikus stapes talpaktól és cadaver humán veseszövetből RAAS-specifikus immunfluoreszcens analízis végzése. A kapott fehérje expressziós szintek és az eloszlási viszonyok értelmezése.

Az első olyan nemzetközi genetikai asszociációs vizsgálat létrehozása, amely szövettanilag igazolt otosclerosisos- és nem-otosclerosisos betegek teljes DNS állományára épül, és a korábban leírt génspecifikus SNP-k szerepét tanulmányozza.

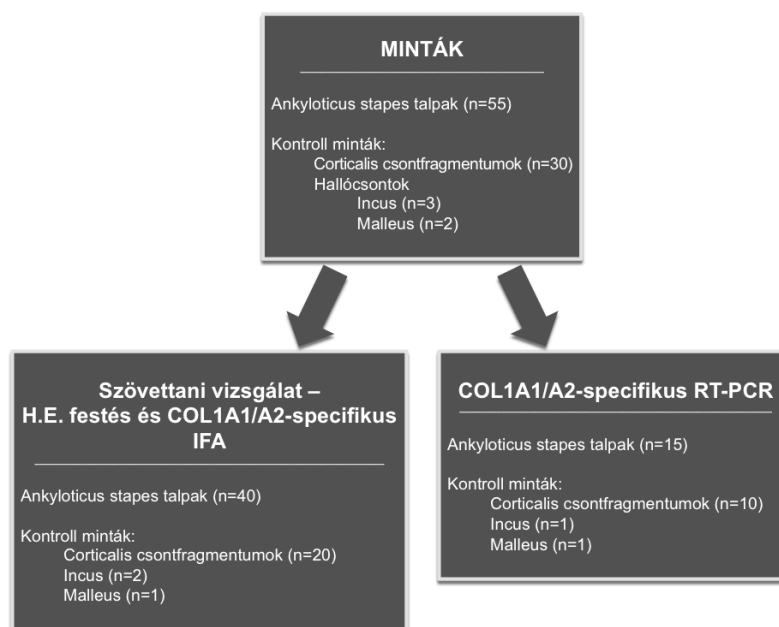
## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Betegek és kontrollok

Jelen tudományos összefoglaló munka négy kísérletsorozat eredményeit foglalja össze, ennek megfelelően a vizsgálatokban felhasznált beteganyagot is négy részre szeparálva mutatjuk be:

1. *COL1A1 és COL1A2: Az I-es típusú kollagén A1 és A2 alléljeinek vizsgálata szövettanilag igazolt stapes talpakban és kontroll csontokban (hematoxinin-eozin festés, COL1A1- és COL1A2-specifikus immunfluoreszcens festés, COL1A1- és COL1A2-specifikus RT-PCR).*

Az első kísérletben stapedectomia során összesen 55 ankylotikus stapest ( $n=55$ , nő=34, férfi=21) távolítottunk el klinikailag stapes fixációban szenvedő betegekből (átlag életkor 39,47 év, 23-71 év). Emellett laterális atticotomia során 30 különböző kortikális csontfragmentumot



**22. ábra** Az I-es típusú kollagén kimutatás vizsgálati tervének sémás bemutatása.

gyűjtöttünk stapes ankylosisos betegek külső hallójáratból csontspecifikus kontrollnak. Középfül cholesteatomás betegek CWD (canal wall down) mastoidectomiája kapcsán 3 db incus és 2 db malleus mintához jutottunk. Az eltávolított csontokat azonnal 10%-os formalinban fixáltuk. A stapes fixáció diagnózisa klinikai, audiológiai és tympanometriai vizsgálatok alapján történt. Tisztahang küszöbaudiometriával a csont-lég köz értéke 1000 Hz-en legalább 30 dB-nek mutatkozott. A stapes fixációs esetek preoperatív tympanometriája 67,27%-ban

As-típusú és 32,73%-ban A-típusú tympanogramot eredményezett. Az otosclerotikus és a nem-otosclerotikus stapes fixációkat posztoperatív szövettani vizsgálatokkal (HE) különítettük el egymástól. A mintáinkat egyenlőtlenül két részre osztottuk<sup>74</sup> (22. ábra).

2. *BMP 2, 4, 5 és 7: A BMP 2, 4, 5 és 7 immunhisztokémiai kimutatása szövettanilag igazolt stapes talpakból és kontroll csontokból (hematoxilin-eozin festés, BMP 2-, 4-, 5- és 7-specifikus immunfluoreszcens analízis)*

A második kísérletben 67 ankylotikus stapes ( $n=67$ , férfi=26, nő=41) került eltávolításra stapedectomy kapcsán. A betegek átlagos életkora 42,28 évnek (25-65 év) bizonyult. A stapes talpak csontspecifikus kontrolljaként 35 kortikális csontfragmentumot gyűjtöttünk a külső hallójáratból laterális atticotomia során stapes ankylosisban szenvedő betegekből. Középfül cholesteatomás betegek CWD mastoidectomiája hozományaképpen 6 darab incushoz jutottunk. Az eltávolított mintákat haladéktalanul 10%-os formalinban fixáltuk. A stapes fixáció diagnózisa a klinikai vizsgálatok, audiológiai és tympanometriai leletek alapján történt. 1000 Hz-en a csont-lég köz legalább 30 dB-nek mutatkozott tisztahang köszöbaudiometriával mérve. A stapes fixációs esetek 79,1%-ában As-típusú, míg 20,9%-ban A-típusú tympanogramot mutatott ki a preoperatív analízis. Az otosclerotikus és a nem-otosclerotikus stapes fixációkat posztoperatív szövettani vizsgálatokkal (HE) különítettük el egymástól<sup>3</sup>.

3. *RAAS: A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer immunfluoreszcens vizsgálata szövettanilag igazolt stapes talpakban, kontroll csontokban és cadaver humán vese-szövetmintában (hematoxilin-eozin festés, renin-, ACE-, AT II-, AT IIR-specifikus immunfluoreszcens próba).*

A harmadik kísérletben stapedectomy során 20 ankylotikus stapest ( $n=20$ , nő=16, 4=férfi) távolítottunk el klinikailag stapes fixációban szenvedő betegekből (átlag életkor 47,35 év, 24-56 év). Továbbá laterális atticotomia során 10 különböző kortikális csontfragmentumot gyűjtöttünk stapes ankylosisos betegek külső hallójáratból csontspecifikus kontrollnak. Mindemellett 10 humán cadaver vese-szövetmintát ( $n=10$ , nő=6, férfi=4) használtunk fel a RAAS szövetspecifikus kontrolljaként. A cadaver mintákat a halál beállta után, kevesebb mint 20 órán belül eltávolítottuk. A pozitív kontrollok átlag életkora 52,17 évnek (46-62 év) bizonyult. A csont mintákat 10%-os formalinban fixáltuk. A stapes fixáció diagnózisa klinikai,

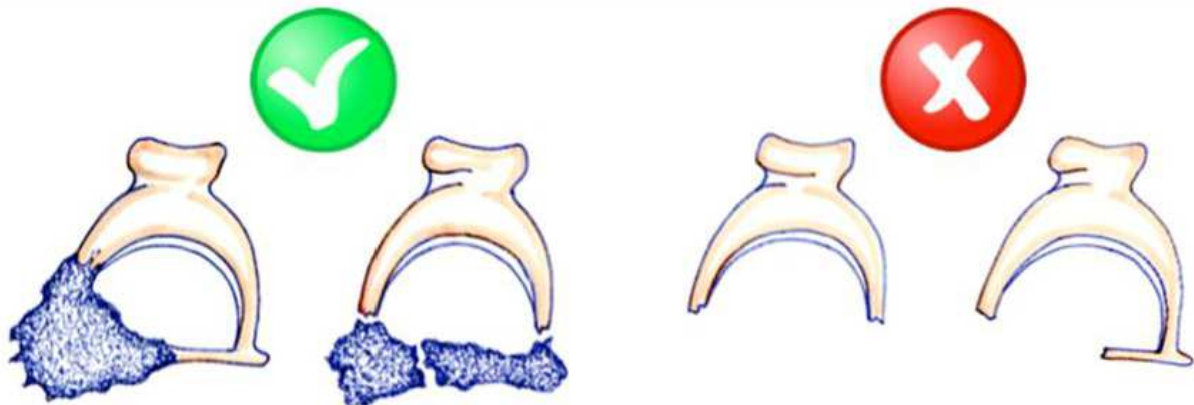
audiológiai és tympanometriai vizsgálatok alapján történt. Tisztahang küszöbaudiometriával a csont-lég köz 1000 Hz-en legalább 30 dB-nek mutatkozott. A stapes műtét indikációja az érintett fül 1024 Hz-es hangvilla Rinne negativitásán alapult. A preoperatív tympanometria 32 (80%) fülön As-típusú, míg 8 (20%) esetben A-típusú tympanogramot tárt fel. Az otosclerosis szövettani diagnózisának megállapítása hagyományos HE festéssel történt. Jelen vizsgálatban az összes felhasznált ( $n=20$ ) stapes minta otosclerotikusnak mutatkozott<sup>83</sup>.

4. *Asszociáción alapuló tanulmány: Klinikailag stapes ankylosis és szövettanilag megerősített otosclerotikus betegek asszociációs vizsgálata az otosclerosisra hajlamosító gének identifikálása céljából, melyben a COL1A1, a TGF- $\beta$ 1, a BMP2, a BMP4, az AGT és a RELN gének SNP-it analizáltuk.*

A negyedik kísérletben összesen 153 klinikai és szövettanilag igazolt otosclerotikus beteg ( $n=153$ , férfi=65, nő=88) vett részt. A betegek átlag életkora 44,71 évnek (24-62 év) bizonyult. Tisztahang küszöbaudiometriával a preoperatív csont-lég köz 1000 Hz-en legalább 30 dB-nek mutatkozott, azonban az érintett fül műtéti indikációja az 1024 Hz-es hangvilla Rinne negativitásán alapult. A preoperatív tympanometria 139 esetben (90,84%) As-típusú, míg 14 betegnél (9,16%) A-típusú görbét adott. Minden esetben készült multifrekvenciás tympanometria, mely 93 fülön (60,78%) 1100Hz feletti rezonancia frekvenciát tárt fel. 121 beteg (79,08%) szenvedett klinikailag bilaterális stapes fixációban. A klinikai és szövettanilag igazolt otosclerosisos betegek vérmintáit posztoperatív módon gyűjtöttük be. Ugyancsak vérmintákat szereztünk halláscsökkenésben nem szenvedő és otoszkópos vizsgálat során betegségmentesnek nyilvánított önkéntesektől ( $n=300$ , férfi=131, nő=169) klinikai kontroll gyanánt. Kontroll csoportunk átlag életkora 39,74 év (22-65 év) volt. Az otosclerotikus és a nem-otosclerotikus stapes fixációkat posztoperatív szövettani vizsgálatokkal (HE) különítettük el egymástól<sup>95</sup>.

Klinikailag a stapes fixáció gyakran bilaterális jelleget öltött, mindazonáltal minden betegből csak egy stapest nyertünk ki és analizáltunk, mivel ilyen rövid időtartam alatt csak unilaterális stapes sebészet végezhető. A részlegesen eltávolított stapes talpak nem kerültek be a vizsgálatba, mert ilyenkor pont a léziót tartalmazó elülső vagy hátsó pólus maradhat vissza

az ovális ablak fülkéjében. A töredezett és teljesen rekonstruált talpak nem lettek kizárva (23. ábra).



**23. ábra** Morfológiai szempontok a stapes minták kiválasztásánál és szövettani feldolgozásánál. A teljes, vagy fragmentált, de rekonstruálható stapes minták bekerültek a vizsgálatokba, míg a szuperstruktúrákat, illetve az esetleges fixációt okozó léziót nem tartalmazó, hiányos stapes mintákat a további feldolgozásból kizártuk.

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 84-227/2008-1018EKU; ETT-TUKEB/2008-113-547/89) engedélyével végeztük. Minden beteg írásos tájékozott beleegyezését adta vizsgálatainkhoz. A tanulmányok a Helsinki Deklaráció szerint mentek végbe. A minták összegyűjtésében a Bajcsy-Zsilinszky Kórház Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Osztály, a DEOEC Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika és DEOEC Patológia voltak együttműködő partnereink.

## 4.2. Szövettani vizsgálatok

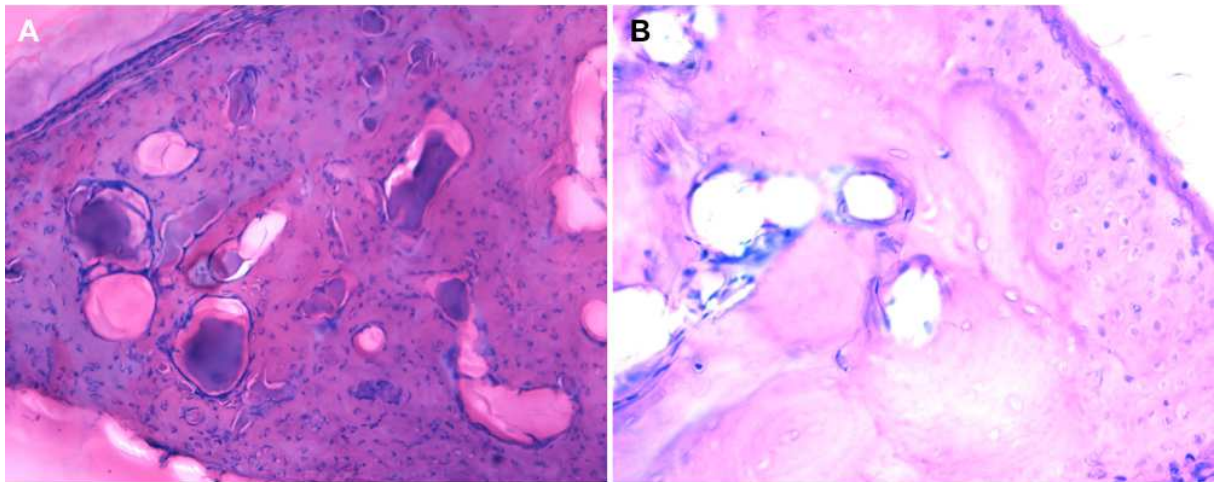
A műtétileg eltávolított stapes mintákat azonnal 10%-os formalinban fixáltuk a szövettani vizsgálatokhoz. A stapes talpakat és a kontroll csontokat 0,02%-os Na-azid-ot tartalmazó 0,5 M-os Na-EDTA (nátrium etilén-diamino-tetraacetát) (72 h, 4°C) oldatban dekalcináltuk. A mintákat 15%-os analitikai tisztaságú zselatinba ágyasztuk (24 h, 56°C), majd ezt követően 4%-os paraformaldehid oldatban újrafixáltuk (24 h, 20°C). A szövettani blokkok krioprotekciójáról 20%-os szacharóz oldat (2 h, 4°C) gondoskodott, majd a zselatinos blokkokból kriosztát (MNT-200 cryomicrotome, Slee, Mainz, Németország) segítségével -25°C-on 10 µm vastagságú úszó metszeteket készítettünk. A szeleteket 0,03%-os Na-azid tartalmú 0,1 M-os PBS (foszfátpufferolt szalin) oldatban tároltuk felhasználásig 4°C-os

hőmérsékleten. Az így elkészült metszeteket többféle módszerrel is vizsgáltuk, ennek megfelelően többféleképpen használtuk fel őket: 1.) hagyományos HE festés; 2.) immunfluoreszcens vizsgálatok; 3.) nukleinsav extrakció, amely a COL1A1/A2-specifikus RT-PCR reakció kivitelezéséhez volt szükséges. Metszeteink tárgylemezre úsztatása és rászárítása után végeztük el a HE festést. Fénymikroszkópos (Axioskop2 MOT Zeiss, Jena, Németország) vizsgálattal állapítottuk meg a stapes fixációk pontos szövettani diagnózisát, majd eredményeinket *jpeg* formátumban digitálisan archiváltuk.

Az otosclerosis szövettani diagnózisának megállapításakor az alábbi kritérium rendszer segítségével végeztük el a differenciációt:

*Aktív otosclerosis:* A metszet dominánsan bazofil, a stapes talp erősen megvastagodott, mindemellett a képet a nem elhanyagolható hipervaszkuarizáció uralja. A tág pszeudovaszkuarís tereket emelkedett számú, alakatlan és sokmagvú oszteoklaszt tölt ki. A marginális zónában többrétegű endotél sejt proliferáció ismerhető fel. A göcök jelentős mennyiségű oszteoklasztot, oszteoblasztot és oszteocitát tartalmaznak. A csontszerkezet fonatos elrendeződést mutat.

*Inaktív otosclerosis:* A metszet inkább eozinofil és igen sejtzegény. A hipervaszkuarizáció továbbra is megfigyelhető, azonban eltömődött vaszkuláris terek és reszorpciós lakúnák jelennek meg. Az oszteoklasztok és az oszteoblasztok szinte teljesen eltűntek, elszórva található néhány oszteocita. A csontszerkezet lemezes jellegű (24. ábra).



**24. ábra** Az aktív (A) és inaktív (B) otosclerosis hematoxilín-eozin festéssel elkészített szövettani metszete.

### 4.3. I-es típusú kollagén A1 és A2 allélspecifikus immunfluoreszcens próba

Az ankylotikus stapes talpak első sorozatát ( $n=40$ ), kortikális csontfragmentumokat ( $n=20$ ), incus ( $n=2$ ) és malleus ( $n=1$ ) mintákat azonnal 10%-os pufferelt formalinban fixáltuk, majd dekalcináltuk 0,02%-os Na-azid-ot tartalmazó 0,5 M-os Na-EDTA oldattal 72 órán keresztül 4 °C-os hőmérsékleten. A dekalcinált mintákat 15%-os analitikai tisztaságú zselatinba (Sigma-Aldrich, USA) ágyasztuk (24 h, 56°C), majd a lehűtött és megformázott zselatinos blokkokat 4%-os paraformaldehid oldattal újrafixáltuk (24 h, 20°C). Az elkészült és fixált blokkokon krioprotekciót végeztünk 20%-os szacharóz oldat segítségével (2 h, 4°C). Az így előkészített mintákból 10 µm-es vastagságú úszó metszeteket készítettünk kriosztát segítségével (MNT-200 cryomicrotome, Slee, Mainz, Germany) –25°C-os hőmérsékleten. Az elkészült metszeteket 0,03% Na-azid-ot tartalmazó 0,1 M-os PBS-ben tároltuk 4°C-os hőmérsékleten az immunfluoreszcens reakció kivitelezéséig.

Minden egyes mintából három egymást követő 10 µm vastagságú fagyasztott metszetet a következőképpen vizsgáltunk: 1) hematoxin-eozin festés; 2) COL1A1-specifikus (Fluorescein-isothiocyanate, FITC, zöld) immunfluoreszcens analízis; és 3) COL1A2-specifikus (Texas Red, TR, piros) immunfluoreszcens próba (IFA). Az első metszeteket minden egyes mintából hagyományos HE festéssel dolgoztuk fel. A második és harmadik sorozatot minden egyes mintából átmostuk, és a fehérjéket számár normális szérumot (SC-2044, Santa Cruz, CA, USA) tartalmazó 0,2 M-os PBS oldattal **blokkoltuk**. A blokkolt metszeteket 1:200 poliklonális kecskében előállított anti-humán COL1A1 primer antitest oldattal (48 h, 20°C) (SC-8784, Santa Cruz, CA, USA) és 1:200 monoklonális egerben termeltetett anti-humán COL1A2 primer antitest oldattal (48 h, 20°C) (SC-166865, Santa Cruz, CA, USA) folyamatos rázás mellett inkubáltuk. A **primer antitesteket** 0,2 M-os PBS-sel mostuk ki és 1:300 számban előállított anti-kecske FITC-tal jelölt IgG oldattal (12 h, 20°C) (SC-2042, Santa Cruz, CA, USA) és 1:300 kecskében termeltetett anti-egér TR-rel jelölt IgG oldattal (12 h, 20°C) (SC-2983, Santa Cruz, CA, USA) folyamatos rázás mellett inkubáltuk. A **szekunder antitest** kötés után a metszeteket UV transzparens médiummal **fedtük** (Vectashield™, Vector Laboratories, CA, USA). A képfeldolgozást 510 nm-es és 470 nm-es hullámhosszon, 69-87 ms-os expozíciós idővel végeztük UV fény alatt. A fényképeket *jpeg* formátumban **archiváltuk** (Axioskop2 MOT™, Axiovision 3.0™, Zeiss, Jena, Németország).

#### 4.4. I-es típusú kollagén A1 és A2 allélspecifikus real-time PCR (RT-PCR)

Az ankylotikus stapes talpak második sorozatát ( $n=15$ ), kortikális csont ( $n=10$ ), malleus ( $n=1$ ) és incus ( $n=1$ ) mintákat steril szilikon csövekben tároltuk  $-70^{\circ}\text{C}$ -os hőmérsékleten. A szövetmintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk és steril dörzscsészében porrá zúztuk. A porított mintákat dietil-pirokarbonáttal (DEPC) kezelt desztillált vízben oldottuk fel. A homogenizált szövetet tartalmazó oldatból a teljes RNS tartalmat TRI Reagent<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldattal vontuk ki a gyártó instrukciói alapján. A reverz transzkripciót  $1\ \mu\text{g}$  RNS-en  $20\ \mu\text{l}$ -es térfogatban High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit<sup>TM</sup>-tel végeztük hexagonális random primerekkel a gyártó utasítása szerint. A COL1A1/A2 specifikus primereket online Primer-BLAST<sup>TM</sup> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) szoftver segítségével hoztuk létre, felhasználva a COL1A1 és COL1A2 transzkripció variánsainak mRNS szekvenciáit (COL1A1: NM\_000088.3, GI: 110349771; és COL1A2: NM\_000089.3, GI: 48762933). A COL1A1 és A2 mRNS 3' végét áthidaló RT-primereket (COL1A1for 5'-3': CCC TCC CCA GCC ACA AAG AGT CT, GC%=60.87, Tm=59.86°C és COL1A1rev 5'-3': GGG TGA CTC TGA GCC GTC GG, GC%=70, Tm=58.88°C; és COL1A2for 5'-3': GAG GGC GGA GGT ATG CAG ACA AC, GC%=60.87, Tm=59.33°C és COL1A2rev 5'-3': TGG GTC ACC GGC GGA GGT ATC, GC%=66.67, Tm=60.04°C) alkalmaztunk a cDNS PCR-ben (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A termék becsült mérete a COL1A1 esetében 348 bázispárnak, míg a COL1A2 tekintetében 374 bázispárnak mutatkozott. Az amplifikációs reakciót  $25\ \mu\text{l}$ -es térfogatban végeztük, mely 1 x PCR puffert, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, minden dNTP-ből  $100\ \mu\text{M}$ -t, mindkét primerből  $0,2\ \mu\text{M}$ -t, 2,5 U AccuTaq LA DNA Polymerase<sup>TM</sup>-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és  $2\ \mu\text{l}$  cDNS-t tartalmazott. Az ideális PCR feltételekhez előzetesen 2 percig denaturáltunk  $94^{\circ}\text{C}$ -on; majd 35 ciklusban 15 másodperc denaturáció  $94^{\circ}\text{C}$ -on, 30 másodperc annealáció  $60^{\circ}\text{C}$ -on, 1 perc extenzió  $68^{\circ}\text{C}$ -on és a végső extenzió következett 5 percig  $68^{\circ}\text{C}$ -on. A negatív kontroll RT-PCR-ek minden kísérletben DNS-mentes vízzel készültek. Az kivont RNS minták alkalmasságát h36B4 + (5'-3': AGA TGC AGC AGA TCC GCA T) és h36B4 – (5'-3': ATA TGA GGC AGG AGT TTC TCC AG) primer humán riboszómális RNS használatával teszteltük. A humán riboszómális RNS specifikus háztartási kontroll RT-PCR-t minden mintánál elvégeztük.

#### 4.5. BMP 2, 4, 5 és 7-specifikus immunfluoreszcens próba

Vizsgálatunkban 67 ankylotikus stapes ( $n=67$ ), 35 kortikális csontfragmentum ( $n=35$ ) és 6 incus ( $n=6$ ) mintát 10%-os pufferolt formaldehid oldatban fixáltuk, majd 0,02%-os Na-azid-ot tartalmazó 0,5 M-os Na-EDTA (72 h, 4°C) oldatban dekalcináltuk. A mintákat 15%-os analitikai tisztaságú zselatinba ágyasztuk (24 h, 56°C), majd 4%-os paraformaldehid oldatban újrafixáltuk (24 h, 20°C). A szövettani blokkok krioprotekciójáról 20%-os szacharóz oldat (2 h, 4°C) gondoskodott. A 10  $\mu\text{m}$  vastagságú metszetek  $-25^\circ\text{C}$ -on készültek (MNT-200, Slee, Mainz, Németország). A szeleteket 0,03%-os Na-azid-ot tartalmazó 0,1 M-os PBS oldatban 4°C-os hőmérsékleten tároltuk.

Öt egymást követő 10  $\mu\text{m}$  vastagságú fagyasztott metszetet a következőképpen analizáltunk: 1) HE festés; 2) BMP2; 3) BMP4; 4) BMP5; és 5) BMP7-specifikus immunfluoreszcens próba. Először minden egyes mintából nyert metszetet hagyományos HE festéssel dolgoztunk fel. Az IFA metszetek sorozatát átmostuk és Power Block™ Reagent (BG-BS-1310-25, Biogenex, Fremont, CA, USA) segítségével **blokkoltuk**. A blokkolt metszeteket 1:20 monoklonális egérben előállított anti-humán *BMP2* primer antitest oldattal (24 h, 20°C) (RD-MAB2260, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 1:20 poliklonális kecskében termelt anti-humán *BMP2/4* primer antitest oldattal (24 h, 20°C) (RD-AF355, R&D Systems), 1:20 poliklonális kecskében előállított anti-humán *BMP5* primer antitest oldattal (24 h, 20°C) (RD-AF615, R&D Systems) és végül 1:20 monoklonális egérben termelt anti-humán *BMP7* primer antitest oldattal (24 h, 20°C) (RD-MAB3542, R&D Systems) folyamatos rázás mellett inkubáltuk. A **primer antitesteket** 0,2M PBS-sel kimostuk és a metszetek egyenként 1:200 NL-493 fluorokrómmal jelölt Northern Lights™ számárban előállított anti-kecske IgG-vel (6 h, 20°C) (R&D Systems) és 1:200 NL-637 fluorokrómmal jelölt Northern Lights™ számárban termelt anti-egér IgG-vel (6 h, 20°C) (R&D Systems) folyamatos rázás mellett inkubáltuk. Az összes antitest inkubáció steril, párás kamrában zajlott. A **szekunder antitest** kötés után a metszeteket UV transzparens médiummal **fedtük** (Vectashield™, Vector Laboratories, CA, USA). A képfeldolgozást 510 nm-es és 470 nm-es hullámhosszon, 43-77 ms-os expozíciós idővel végeztük UV fény alatt. A fényképeket *jpeg* formátumban **archiváltuk** (Axioskop2 MOT™, Axiovision 3.0™, Zeiss, Jena, Németország).

#### 4.6. RAAS-specifikus (renin, ACE, AT-II és AT-IIR) immunfluoreszcens próba

Az ankylotikus stapes talpakat ( $n=20$ ), kortikális csontfragmentumokat ( $n=10$ ) és a vese szövetmintákat ( $n=10$ ) haladéktalanul 10%-os formalinban fixáltuk. A stapes talpakat és a kortikális csontokat 0,02%-os Na-azid-ot tartalmazó 0,5 M-os Na-EDTA (72 h, 4°C) oldatban dekalcináltuk. Az emberi vese minták nem lettek Na-EDTA-val kezelve. A mintákat 15%-os analitikai tisztaságú zselatinba ágyasztuk (24 h, 56°C), majd 4%-os paraformaldehid oldatban újrafixáltuk (24 h, 20°C). A szövettani blokkok krioprotekciójáról 20%-os szacharóz oldat (2 h, 4°C) gondoskodott és -25°C-on 10 µm vastagságú szeleteket metszettünk (MNT-200, Slee, Mainz, Németország) belőlük. A szeleteket 0,1 M-os PBS és 0,03%-os Na-azid oldatban 4°C-os hőmérsékleten tároltuk.

Öt egymást követő 10 µm vastagságú fagyasztott metszetet a következőként vizsgáltunk: 1) HE festés; 2) renin-specifikus IFA; 3) AT-II-specifikus IFA; 4) ACE-specifikus IFA; és 5) AT-IIR-specifikus IFA. Az *első metszeteket* minden egyes blokkból hagyományos HE festéssel dolgoztuk fel. A további sorozatokat átmostuk, és a fehérjét számár normális szérumot (SC-2044, Santa Cruz, CA, USA) tartalmazó 0,2 M-os PBS oldattal **blokkoltuk**. A *második metszeteket* 1:200 poliklonális nyúlban előállított anti-humán renin primer antitest oldattal (48 h, 20°C) (SC-22752, Santa Cruz, CA, U.S.A.) folyamatos rázás mellett inkubáltuk. A **primer antitesteket** 0,2 M-os PBS-sel mostuk ki és 1:300 **szekunder** Texas Red-jelölt IgG oldattal (12 h, 20°C) (Santa Cruz) folyamatos rázás mellett inkubáltuk. A *harmadik metszeteket* 1:200 monoklonális egérben termelt anti-humán angiotenzin-II primer antitest oldattal (48 h, 20°C) (SC-374511, Santa Cruz) inkubáltuk. A primer antitesteket 0,2 M-os PBS-sel mostuk ki és 1:300 másodlagos Texas Red-jelölt IgG oldattal (12 h, 20°C) (Santa Cruz) inkubáltuk. A *negyedik metszeteket* 1:200 poliklonális kecskében előállított anti-human angiotenzin-II Receptor primer antitest oldattal (48 h, 20°C) (SC-7421, Santa Cruz) inkubáltuk. A primer antitesteket 0,2 M-os PBS-sel mostuk ki és 1:300 másodlagos FITC-jelölt IgG oldattal (12 h, 20°C) (Santa Cruz) inkubáltuk. Az *ötödik metszeteket* 1:200 monoklonális egérben előállított anti-humán ACE primer antitest oldattal (48 h, 20°C) (SC-73668, Santa Cruz) inkubáltuk. A primer antitesteket 0,2 M-os PBS-sel mostuk ki és 1:300 másodlagos FITC-jelölt IgG oldattal (12 h, 20°C) (Santa Cruz) inkubáltuk. A metszeteket UV transzparens médiummal **fedtük** (Vectashield™, Vector Laboratories, CA, USA). A képfeldolgozást 486 nm-es és 510 nm-es hullámhosszokon végeztük 69 ms-os

expozíciós idővel, UV fény alatt. A fényképeket *tif* formátumban archiváltuk (Axioskop2 MOT™, Axiovision 3.0™, Zeiss, Jena, Németország).

#### 4.7. Genotipizálás

A tanulmányban résztvevők ( $n=153$ ) antikoagulált (EDTA) vér mintáiból genomikus DNS izolációt végeztünk QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Venlo, Hollandia) segítségével. Korábbi tanulmányok alapján a COL1A1, a TGF- $\beta$ 1, a BMP2, a BMP4, az AGT és a RELN gének tizenhárom SNP-jét próbáltuk statisztikai kapcsolatba hozni az otosclerosissal<sup>28,38,96,97</sup>. A vizsgálat kivitelezésére és az SNP genotipizálásra a K-Biosciences-ben (Hoddesdon, Egyesült Királyság) került sor.

#### 4.8. Power calculation

A statisztikai kalkulációt (power calculation) a Genetic Power Calculator<sup>98</sup> szoftver segítségével végeztük, hogy felbecsülhessük a replikációs tanulmányunk méretét (mintaszám) annak tükrében, hogy elégséges-e a korábban leírt genetikai asszociációk vizsgálatához<sup>99</sup>. Minden egyes SNP-re meghatároztuk a betegség allélgyakoriságát (disease allele frequency, DAF) és az odds ratio (OR) mértékét a korábban megjelent genetikai tanulmányok adatait felhasználva<sup>28,38,96,97</sup>. A DAF értékét 0,35%-ra állítottuk be.

#### 4.9. Asszociációs tesztelés

A statisztikai elemzést IBM SPSS statistics 2.0 szoftver (IBM, Egyesült Államok) és az R studio 0.94.110 online szoftver használatával végeztük. A kontroll minták Hardy-Weinberg (HW) equilibrium értékeit Michael H. Court (2005-2008) online kalkulátorok segítségével számoltuk ki. A különböző genotípusokat lineárisan kódoltuk. Valószínűség-arány teszt (likelihood ratio test, LRT) felhasználásával állapítottuk meg a különbségeket az otosclerosisos és kontroll személyek között, amelyben logisztikus regressziós mintázatot állítottunk be. Mindemellett egy további modellt is használtunk, mely megbecsülte a betegség kialakulási rizikójának valószínűségét olyan esetekben, amikor a tanulmányozott allélek egymás mellett szimultán, változatos mintázatban fordulnak elő. 0,05 alatt tartottuk

szignifikánsnak a p-értéket. Az rs 3178250 jelű SNP vizsgálata során egyedileg domináns genetikai modellel kalkuláltunk. Amennyiben a p-érték 0,05-nél (rs1800472, TGFB1) kisebbnek bizonyult, minden SNP esetén meta-analízist végeztünk kombináltan, a korábbi publikációkban előforduló belga-holland-, francia- és tunéziai populációk TGFB1-re vonatkozó értékeivel<sup>38,100</sup>. Ugyanakkor a RELN rs3914132 SNP-jének meta-analízisét szintén kombinációs módon végeztük, amelyben belga-holland-, francia-, német-, olasz-, svájci-, román-, tunéziai-, indiai- és magyar populációk adatait vetettük össze<sup>38,100,101</sup>. A kapott adatokra csökkentett logisztikus regressziós modellt illesztettünk, mely tartalmazta az egyes genotípusok különböző populációkra gyakorolt hatásait. Az átlagos OR-t 95%-os Wald konfidencia intervallum mellett az adott genotípus és a hozzá kapcsolódó nagy mintaszámú konfidencia intervallum regressziós koefficiensének felhasználásával számítottuk ki. Az adott allél vagy SNP populációs szintű genetikai hatásának p-értékeit összehasonlító modell alapján számítottuk, ahol az egyik oldalon a populáció és a genotípus áll, a másik oldalon pedig csak a populáció. A kapott adatokat „forest-plot” diagramokon ábráztuk, melyeket a meta MH function in the R package rmeta online szoftver segítségével készítettünk el. Az átlagos OR-t 95%-os konfidencia intervallum mellett a Mantel-Haenszel módszer alapján számítottuk ki.

## 5. EREDMÉNYEK

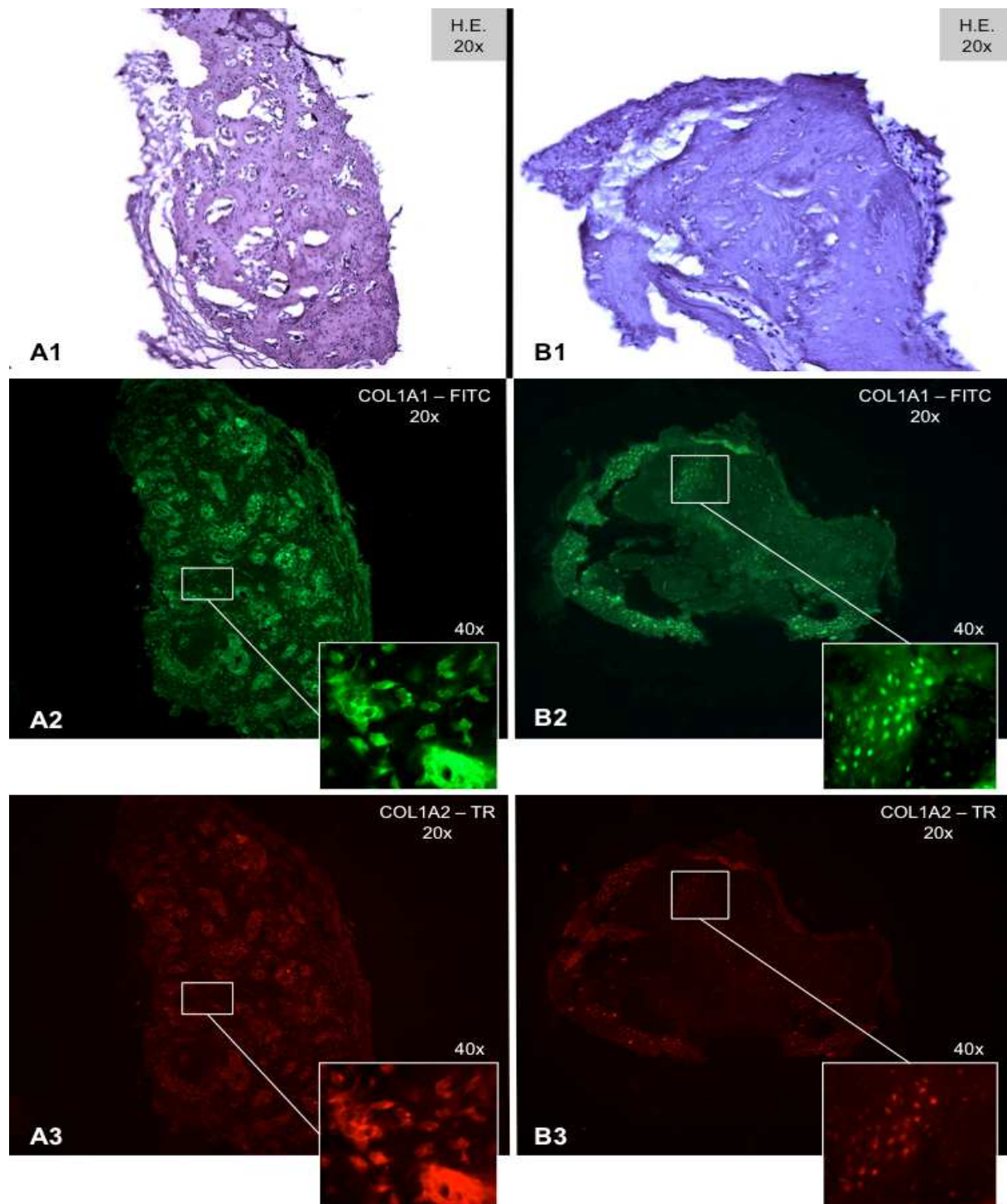
Eredményeinket a „Betegek és kontrollok” fejezet felosztása szerint tárgyaljuk.

### 5.1. COL1A1 és COL1A2

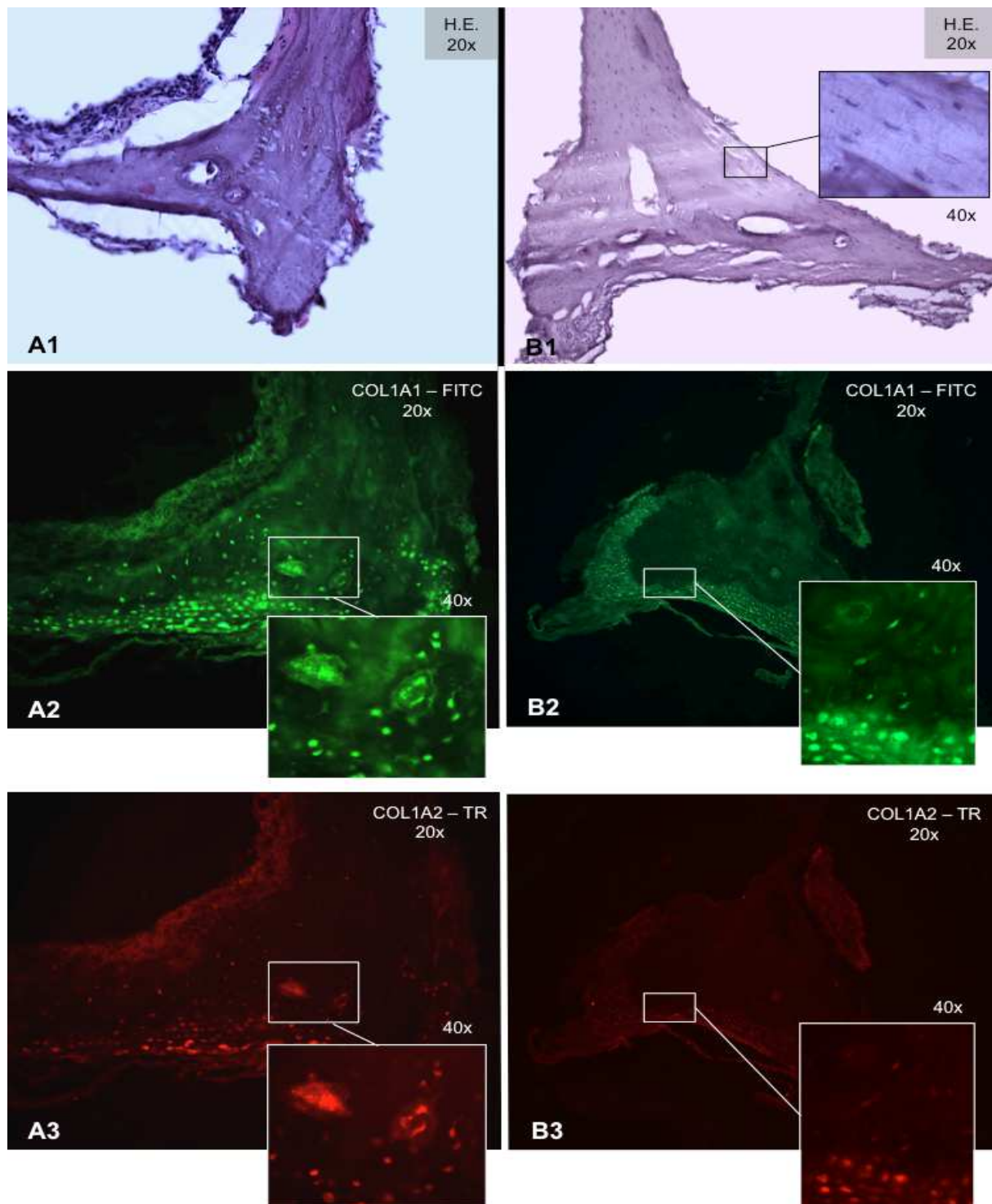
Ankylotikus stapes talpokat ( $n=55$ ), kortikális csontfragmentumokat ( $n=30$ ) és hallócsontokat ( $n=5$ ) egyenként analizáltunk COL1A1- és COL1A2-specifikus RT-PCR-rel és immunfluoreszcens próbával (22. ábra). Hagyományos HE festéssel negyvenből 31 esetben mutattunk ki otosclerosist az ankylotikus stapes talpokról (3. Táblázat). Ezek közül 23 stapes talpban az otosclerotikus lézió aktívnak és nyolc esetben inaktívnek mutatkozott (25. ábra). A 9 nem-otosclerotikus stapes talp szövettani vizsgálata annuláris stapediovesztibuláris kalcifikációt tárt fel jellegzetes stapes talp megvastagodással (26. ábra).

Immunfluoreszcens vizsgálataink alapján az otosclerotikus és a nem-otosclerotikus stapes talpokban normális mennyiségű és egyenletes eloszlású COL1A1 ( $\alpha$ -1 lánc) és COL1A2 ( $\alpha$ -2 lánc) expressziót detektáltunk (25. és 26. ábra). Az  $\alpha$ -1 és  $\alpha$ -2 láncspecifikus immunreakció intenzitása teljesen függetlennek bizonyult a stapes fixáció szövettani diagnózisától. Az immunreaktivitás mértéke nem változott a stapes minták különböző részei között. A szuperstruktúrák, a talpak és a vesztibuláris felszínek hyalinporc rétegei ugyancsak rendkívül hasonló expressziós mintázatot mutattak (25. és 26. ábra). A stapes fixáció negatív kontrolljaként használt kortikális csontok, incus és malleus minták átlagos I-es típusú kollagén expressziót reprezentáltak (27. ábra). A COL1A1/A2 allélek expressziós mintázata nem mutatott szignifikáns korrelációt az otosclerosis szövettani diagnózisával.

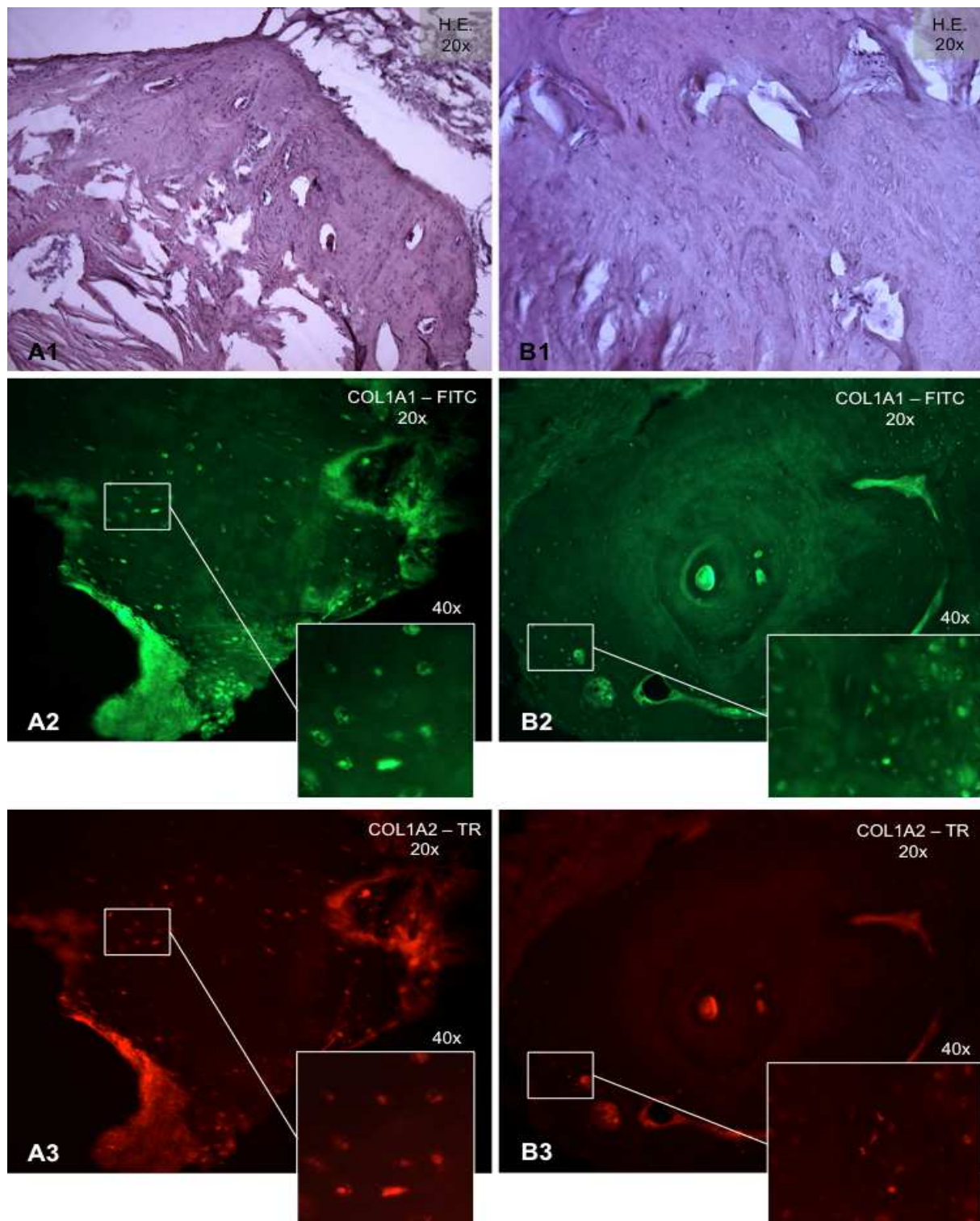
Tizenöt ankylotikus stapes talpból és az összes negatív kontrollból ( $n=12$ ) sikerült humán sejtes RNS-t kimutatni, alátámasztva ezzel azt, hogy az mRNS extrakciós folyamatunk optimálisan működött. Az A1 és A2 allélspecifikus mRNS kimutatása RT-PCR-rel minden stapes talp mintából sikerült (28. ábra). A negatív kontrollként használt kortikális és hallócsontok is szabályos COL1A1/A2 allél expressziót mutattak RT-PCR-rel (28. ábra).



**25. ábra** A különböző szövettani aktivitású otosclerotikus léziók COL1A1 és A2 expressziójának immunfluoreszcens bemutatása. **A1** Az otosclerosis aktív fókusz hypercelluláris oszteoid háttérrel és számtalan pseudovaszkuláris térrel (HE, jobb fül). **A2** Az előző metszet COL1A1-specifikus immunfluoreszcens festése (FITC). A léziót alkotó sejtek erős, granuláris COL1A1-specifikus immunreakciót adnak. **A3** A korábbi metszet COL1A2-specifikus immunfluoreszcens próbája (TR). Az oszteoblasztok és az oszteoklasztok intenzív  $\alpha$ -2 lánc expressziót mutatnak. **B1** A stapes talp hátsó pólusából származó inaktív otosclerotikus góc (HE, jobb fül). A lézió hypocellularitással és üres halo sejtekkel írható le. **B2** Az előző metszet COL1A1-specifikus immunfluoreszcens festése. A léziót képző sejtek maradványai meglehetősen heves citoplazmatikus immunreakciót adnak. **B3** A COL1A2-specifikus immunreakció a korábbi metszethez hasonló mintázatú.



**26. ábra** A nem-otosclerotikus stapes fixációk COL1A1 és A2 expressziójának immunfluoreszcens demonstrációja. **A1** A stapes talp nem-otosclerotikus, annuláris kalcifikációja hypocelluláris és sarkos hátsó pólussal (HE, bal fül). **A2** Az előző metszet COL1A1-specifikus immunfluoreszcens festése. Az oszteociták intenzív immunreakciót adnak. **A3** A COL1A2-specifikus immunfluoreszcens próba hasonlóan erős immunreakciója. **B1** A stapes talp nem-otosclerotikus, annuláris kalcifikációja hypocelluláris oszteoiddal, sarkos és terjedelmes hátsó pólussal (HE, jobb fül). Az apró beillesztett ábrák a normál oszteoid struktúra nagy nagyítású képei. **B2** A korábbi metszet COL1A1-specifikus immunfluoreszcens festése. Az oszteociták és a hyalinporc réteg vesztibuláris felszíne intenzív citoplazmatikus festődésben nyilvánul meg (kis ábra). **B3** A COL1A2 kifejezetten hasonló expressziós mintázatot mutat az oszteocitákban és a kondrocitákban.



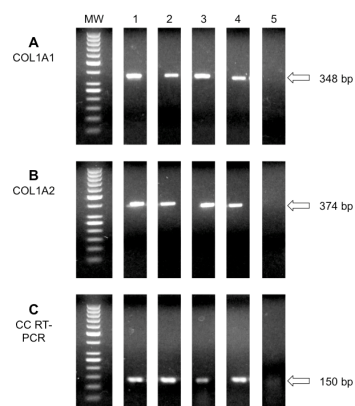
**27. ábra** A csontspecifikus kontrollokban a COL1A1 és A2 expresszió immunfluoreszcens demonstrációja. **A1** Az incus teste normál szerkezetű cement vonalakat és ereket reprezentál (HE, jobb fül). **A2** Az előző metszet pozitív COL1A1-specifikus immunreakciója. **A3** Az oszteociták intenzív COL1A2-specifikus immunfluoreszcens festést mutatnak. **B1** A külső hallójárat hátsó falából begyűjtött kortikális csont (HE, bal fül). **B2** A korábbi metszet pozitív COL1A1-specifikus immunreakciója. **B3** Az oszteociták által normál módon expresszált I-es típusú kollagén  $\alpha$ -2 láncának demonstrációja.

**3. Táblázat.** Ankylotikus stapes talpak különböző szövettani diagnózisának megfelelő COL1A1 és COL1A2 expresszió, összehasonlítva a szövetspecifikus kontrollokkal.

<i>Minták (n=90)</i>	<i>COL1A1 IFA*</i>	<i>COL1A2 IFA</i>	<i>COL1A1 RT-PCR</i>	<i>COL1A2 RT-PCR</i>	<i>CC RT-PCR**</i>
<b>Szövettani csoport</b>					
<i>Aktív otosclerosis (n=23)</i>	++++	++++	n/a***	n/a	n/a
<i>Inaktív otosclerosis (n=8)</i>	+++	+++	n/a	n/a	n/a
<i>Nem-otoscleroticus stapes fixáció (n=9)</i>	++	++	n/a	n/a	n/a
<i>Kortikális csont (n=20)</i>	++	++	n/a	n/a	n/a
<i>Incus (n=2)</i>	++	++	n/a	n/a	n/a
<i>Malleus (n=1)</i>	++	++	n/a	n/a	n/a
<b>RT-PCR csoport</b>					
<i>Ankylotikus stapes talp (n=15)</i>	n/a	n/a	15	15	15
<i>Kortikális csont (n=10)</i>	n/a	n/a	10	10	10
<i>Incus (n=1)</i>	n/a	n/a	1	1	1
<i>Malleus (n=1)</i>	n/a	n/a	1	1	1

\*Az immunfluoreszcens próbák intenzitása (IFA): +, gyenge gyűrűszerű immunreaktivitás; ++, gyenge homogén immunreaktivitás; +++, erős homogén vagy gyenge szemcsézett immunreaktivitás; +++++, erős konfluáló és masszív szemcsézett reakció. \*\*Sejtes kontroll (cellular control) RT-PCR. \*\*\*Nem áll rendelkezésre

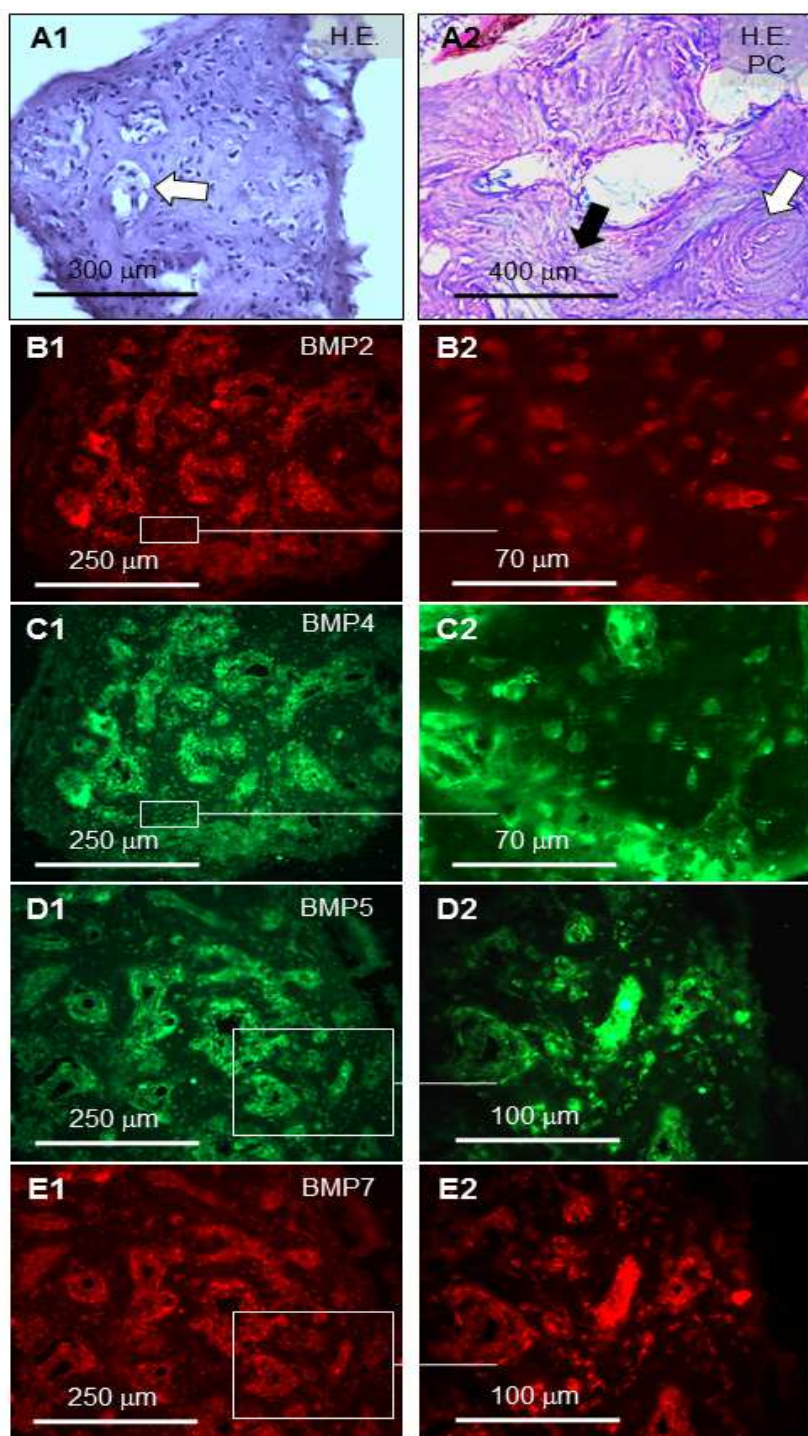
**28. ábra** Az RT-PCR amplimerek szeparációja agaróz gél elektroforézissel. **A** COL1A1 derivált mRNS RT-PCR amplifikációja ankylotikus stapes talpakban (1), kortikális csont fragmentumban (2), malleus (3) és incus (4) mintákban, melyeket negatív kontrollként használtunk. Minden minta pozitív reakciót adott 348 bp-s amplimerekre. Az RNS-negatív kontrollból (5) COL1A1 mRNS-t nem tudtunk kimutatni. **B** A korábbi minták COL1A2 derivált mRNS-ének amplifikációja RT-PCR-rel. Minden minta pozitív reakciót mutatott 374 bp-s amplimerekre. Az RNS negatív kontrollból COL1A2 mRNS-t nem tudtunk kimutatni. **C** A korábbi minták sejtes kontrollja (CC) RT-PCR-rel. Minden minta pozitívítást jelzett humán riboszómális RNS-en (150 bp). Az RNS negatív kontroll nem adott reakciót.



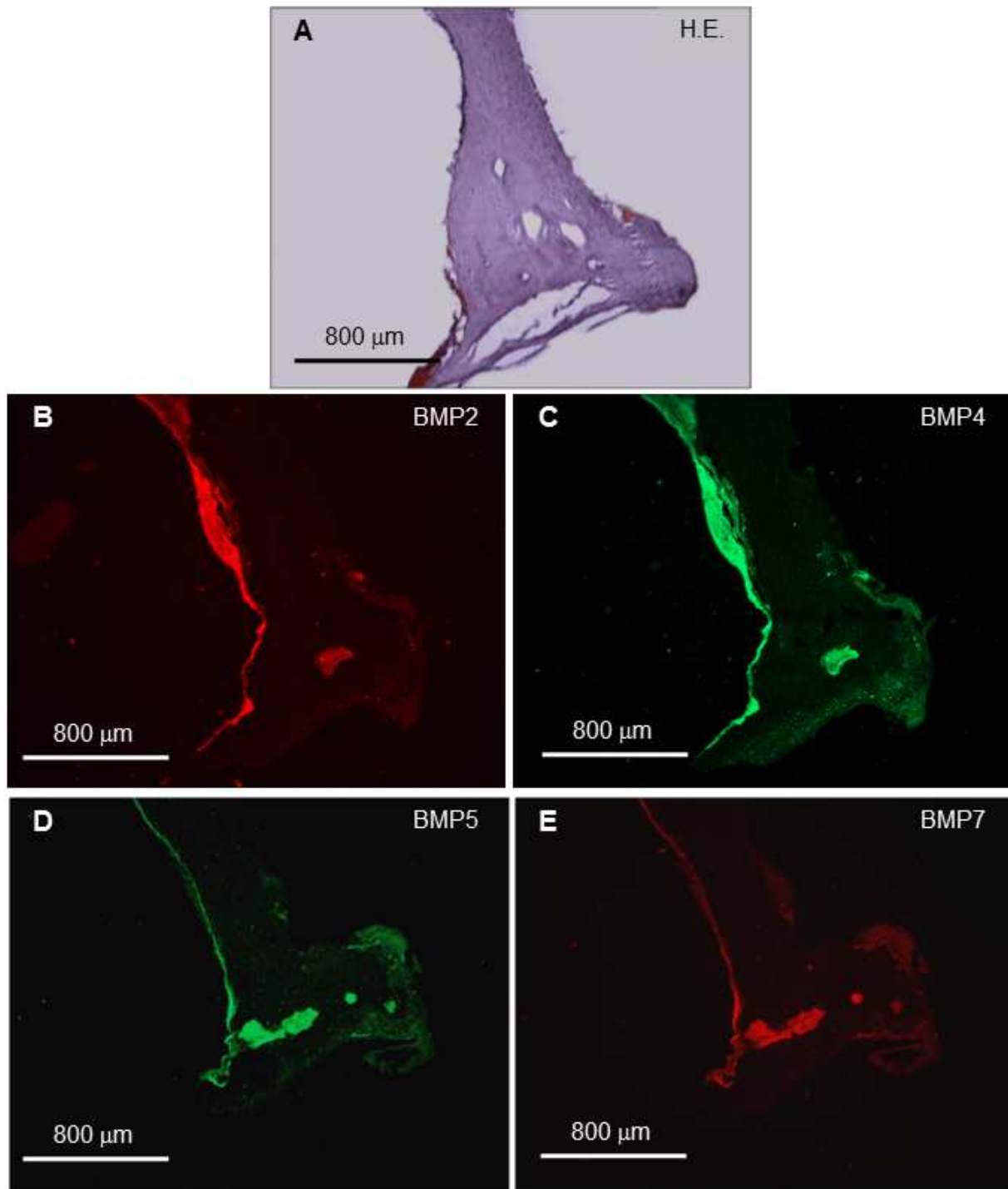
## 5.2. BMP 2, 4, 5, 7

Ankylotikus stapes talpak ( $n=67$ ), kortikális csontfragmentumok ( $n=35$ ) és incus minták ( $n=6$ ) elemzését végeztük egyenként BMP 2-, 4-, 5-, és 7-specifikus immunfluoreszcens próbával és hagyományos HE festéssel. 51 ankylotikus stapes talp esetében diagnosztizáltunk otosclerosist a szövettani vizsgálatok alapján (4. Táblázat). A stapes talpak egyetlen, domináns otosclerotikus fókuszot foglaltak magukban (unipoláris jelleg). A minták között 39 stapes talp otosclerotikus fókusza aktív, míg 12 inaktív mutatkozott (29. és 30. ábra). Az 51 különböző stapes talpban az otosclerotikus léziók eltérő lokalizációban jelentek meg: a mellső pólusban ( $n=31$ ), a hátsó pólusban ( $n=7$ ), bipolárisan ( $n=6$ ) és obliteratív ( $n=7$ ) módon. A 16 nem-otosclerotikus stapes talp esetében a szövettani vizsgálat annuláris stapediovestibuláris kalcifikációt tárt fel a stapes talp diszkrét megvastagodásával (31. ábra). A nem-otosclerotikus betegek klinikai anamnézise és otoszkópos képe alapján krónikus középfülgyulladás talaján kialakult tympanoszklerózis és familiáris stapes fixáció kizárhatóan bizonyult.

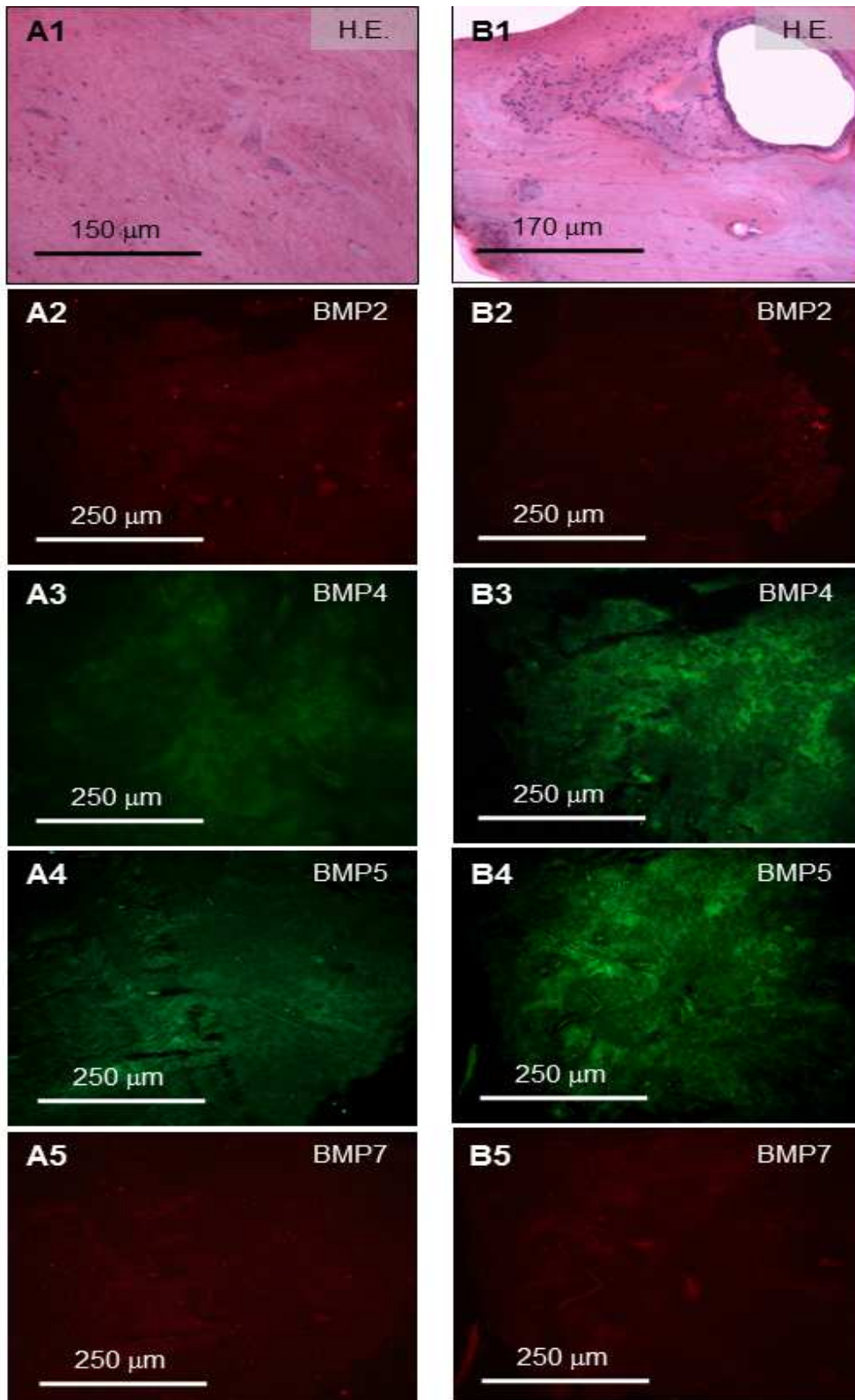
Az aktív otosclerosisos esetek szimultán emelkedett BMP 2, 4, 5 és 7 expressziót mutattak, melyek intenzív granuláris immunreakcióban nyilvánultak meg (29. ábra). Az oszteoklasztok és az oszteoblasztok a különböző típusú BMP-kre tekintélyes pozitivitással reagáltak, ezzel jelezve a lézió belüli aktív csontremodellációt és az újcsontképződést (29. ábra). A BMP immunreaktivitás váltakozott a stapes minták különböző részeiben. A szuperstruktúra negatív volt BMP-re, míg a léziót tartalmazó talp és a vestibuláris felszín hyalinporc rétege nagyon hasonló expressziós mintázatot jelzett. Az erősen pozitív otosclerotikus minták BMP expressziójának optimális expozíciós ideje 43 ms-nak mutatkozott. A BMP negatív mintákban (nem-otosclerosisos talp, kontroll csont) az expozíciós időt 77 ms-ra meghosszabbítottuk, hogy a fals negatív eredmények elkerülhetőek legyenek. Ezzel szemben, inaktív otosclerotikus fókuszokban a sejtes maradványok felszínén nem volt szignifikáns BMP expresszió kimutatható (30. ábra). Ezekben az esetekben a BMP expresszió mennyisége és mintázata szorosan korrelált az otosclerosis szövettani aktivitásával. A nem-otosclerotikus stapes fixációk nem ábrázoltak immunreakciót BMP-re (31. ábra). A negatív kontrollként használt kortikális csontok és incus minták szintén negatív BMP-specifikus immunreakciót adtak (32. ábra). Végezetül, a különböző típusú BMP-k expressziója szoros kapcsolatban állt az otosclerosis szövettani diagnózisával.



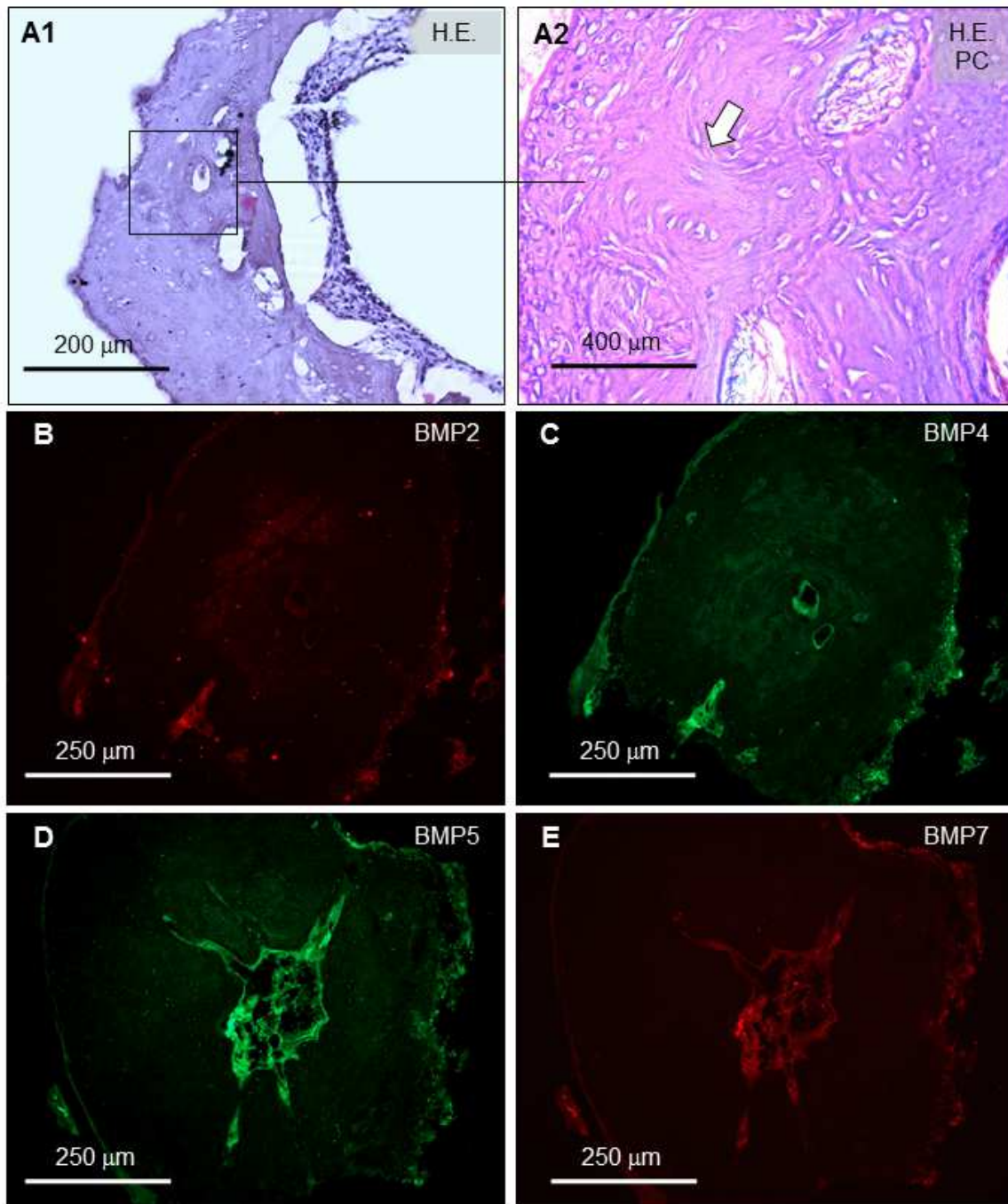
**29. ábra** Aktív otosclerosisban a BMP expresszió immunfluoreszcens demonstrációja. **A1** Aktív otosclerotikus fókusz hipercelluláris oszteoiddal és számos pseudovaszkuláris térrel (fehér nyíl) (HE, jobb fül). **A2** Az előbbi metszet fázis-kontraszt mikroszkópos nézete. A cement vonalak szabálytalan koncentrikus (fehér nyíl) és fonott (fekete nyíl) mintázatot mutatnak. A BMP 2 (**B1, B2**), BMP 4 (**C1, C2**), BMP 5 (**D1, D2**) és BMP 7 (**E1, E2**) -specifikus immunfluoreszcens felvételek különböző nagyítással, melyeken élénk szemcsézett citoplazmatikus immunreakció látszik a léziót létrehozó sejtekben.



**30. ábra** Inaktív otosclerosisban a BMP expresszió immunfluoreszcens demonstrációja. **A** A stapes talp hátsó pólusában lévő inaktív otosclerotikus góc (HE, jobb fül). A lézió hipocellularitással és üres sejtkörűli udvarokkal jellemezhető. A cement vonalak lemezes mintázatot mutatnak. Oszteoblasztok és oszteoklasztok (empty halo cells) maradványai negatívak BMP 2 (**B**), BMP 4 (**C**), BMP 5 (**D**) és BMP 7 (**E**)-specifikus immunfluoreszcens festésre.



**31. ábra** A BMP expresszió immunfluoreszcens demonstrációja nem-otosclerotikus stapes fixációban. **A1, B1** A nem-otosclerotikus stapes talp annuláris kalcifikációja hipocellularitással és szögletes mellső pólussal (H.E., jobb fül). Az oszteociták negatív immunreakciót mutatnak BMP 2 (**A2, B2**), BMP 4 (**A3, B3**), BMP 5 (**A4, B4**) és BMP 7 (**A5, B5**)-specifikus festésre.



**32. ábra** A csontspecifikus kontrollokban a BMP expresszió immunfluoreszcens demonstrációja. **A1** Az incus teste normál szerkezetű cement vonalakat és ereket reprezentál (HE, bal fül). Az oszteociták negatív immunreakciót mutatnak BMP 2 (**B**), BMP 4 (**C**), BMP 5 (**D**) és BMP 7 (**E**) -specifikus festésre. **A2** A külső hallójárat hátsó falából származó kortikális csontfragmentum (HE, bal fül). Az oszteociták nem mutatnak detektálható expressziót BMP 2 (**B**), BMP 4 (**C**), BMP 5 (**D**) és BMP 7 (**E**) -specifikus festésre.

**4. Táblázat.** Az ankylotikus stapes talpak BMP 2, 4, 5 és 7 expressziójának kiértékelése a különböző kórszöveti csoportokban és a kontroll mintákban.

<i>Hisztopatológia (HE)</i>				
<i>(n=108)</i>	<i>BMP2*</i>	<i>BMP4</i>	<i>BMP5</i>	<i>BMP7</i>
<b>Otosclerosis (n=51)</b>				
<b>Aktív fókus (n=39)</b>	+++	++++	+++	+++
<b>Inaktív fókus (n=12)</b>	-	+	-	-
<b>Nem-otosclerotikus stapes fixáció (n=16)</b>				
<b>Annularis kalcifikáció (n=16)</b>	-	-	-	-
<b>Kontroll (n=41)</b>				
<b>Kortikális csont (n=35)</b>	-	-	-	-
<b>Incus (n=6)</b>	-	-	-	-

Az immunfluoreszcens próbák szubjektív kiértékelése intenzitásuk szerint, melyek 40x-es nagyítással, 10 centrálisan fókuszált mező elemzése alapján készültek: +, gyenge gyűrűszerű immunreaktivitás; ++, gyenge homogén immunreaktivitás; +++, erős homogén vagy gyenge szemcsézett immunreaktivitás; +++++, erős konfluáló és masszív szemcsézett reakció.

### 5.3. RAAS

RAAS-specifikus immunfluoreszcens vizsgálattal analizáltunk egyenként válogatott ankylotikus stapes talpakat ( $n=20$ ), kortikális csontfragmentumokat ( $n=10$ ) és humán vese szöveteket ( $n=10$ ).

Az összes ankylotikus stapes talp otosclerosisosnak bizonyult szövettani vizsgálatok megerősítése alapján (5. Táblázat). Jelen betegcsoportból tizenhárom páciens otosclerotikus góca aktívnek, míg 7 inaktívnek mutatkozott (33. ábra). Az otosclerotikus fókuszok elhelyezkedése a 20 stapes talp tekintetében különbözött, leggyakrabban az elülső pólusban ( $n=16$ ) jelentek meg, azonban lokalizálhatóak voltak bipolárisan ( $n=3$ ) és a stapes fülkét obliteráló ( $n=1$ ) módon is. A RAAS-specifikus immunreakciók belső kontrolljaként az összes stapes talp pozitív immunreakciót mutatott TNF- $\alpha$  receptor I-re, mely teljességgel függetlennek bizonyult az otosclerosis szövettani aktivitásától (34. ábra). TNF- $\alpha$  receptor II expresszió 11 aktív otosclerotikus fókuszt tartalmazó mintában volt detektálható (34. ábra).

Korábbi megfigyelésekkel egyetemben, pozitív kontrollként humán vese szövetmintákat alkalmaztunk erőteljes citoplazmatikus RAAS expressziójuk miatt (35. ábra). A glomerulusok epitél sejtjei, a proximális és disztális kanalikulusok és a juxtaglomeruláris apparátus (JGA) módosult neuroendokrin sejtjei is meglehetősen intenzív immunreakcióban pompáztak, ezzel is kihangsúlyozva az egyes nefron egységek komplex struktúráját (35. ábra). Tíz nagy nagyítású mikroszkópos mező (400x) átlagában a renin-, AT II-, ACE-, és AT IIR-t expresszáló sejtek száma egyenként 284,7-, 193,3-, 311,2- és 201,8-nak bizonyult (5. Táblázat).

A csontspecifikus kontrollként használt kortikális csontfragmentumok jelentős mennyiségű RAAS-specifikus immunreakciót adtak (35. ábra). A perivaszkuláris régióban csontvelői progenitor sejtek gyenge gyűrűszerű és helyenként homogén immunreaktivitást produkáltak a RAAS négy tanulmányozott tagja ellen (35. ábra). Tíz nagy nagyítású mikroszkópos mező (400x) átlagában a renin-, AT II-, ACE-, és AT IIR-t expresszáló sejtek száma egyenként 18,9-, 15,6-, 24,8- és 27,1-nek mutatkozott (5. Táblázat). Szöges ellentétben a korábbiakkal, az oszteoid állományba ágyazott egyszerű oszteociták RAAS-specifikus immunreakciója hiányzik (33. ábra).

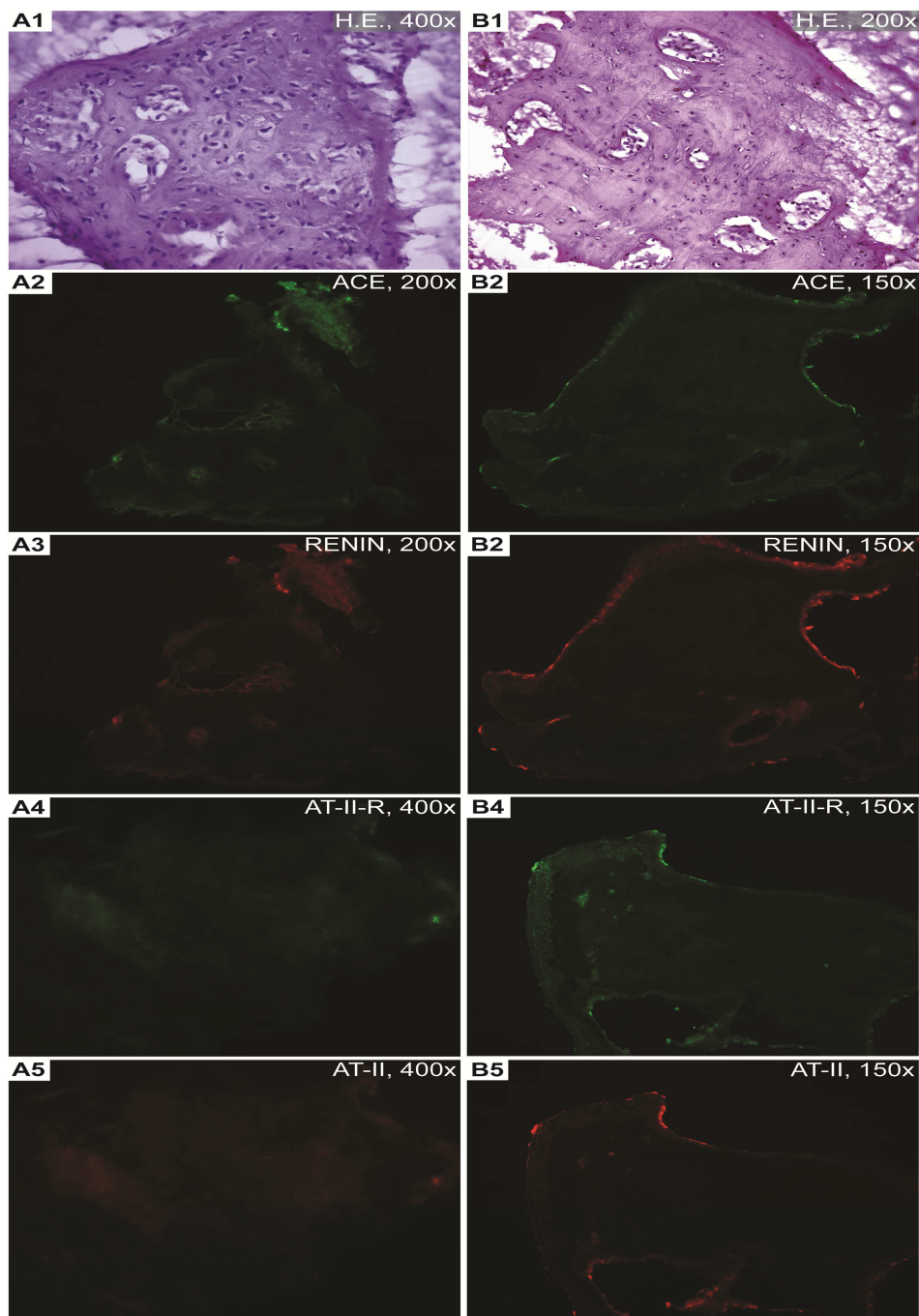
Az aktív vagy inaktív otosclerotikus gócot ábrázoló stapes talpak negatív immunreakcióval jellemezhetőek reninre, AT II-re, ACE-re és AT IIR-ra nézve. Az AT IIR-t

kizárólag a vesztibuláris felszín hyalinporc rétegének maradék kondrocitái expresszálták (33. ábra). Mindenképpen említést érdemel, hogy az UV-átvilágítás expozíciós idejét 134 msec-ra kellett növelnünk, hogy ezt az elhanyagolhatónak tűnő expressziót detektálhassuk. Azonban az expozíciós idő növelése a protein expresszióban nem eredményezett jobb kimutathatóságot. A léziót képző sejtek, mint például az oszteoblasztok, a fibroblasztok és a sokmagvú oszteoklasztok nem okoztak immunreakciót az RAAS vizsgált tagjaiban (33. ábra). A hiányzó fehérje expresszió függetlennek bizonyult a szövettani diagnózistól és az otosclerosis szövettani aktivitásától is. Mivel az otosclerotikus stapes talpak alapvetően negatív RAAS-specifikus fehérje expresszióval jellemezhetőek, így eltekintettünk az RAAS-specifikus mRNS-ek RT-PCR vizsgálatától.

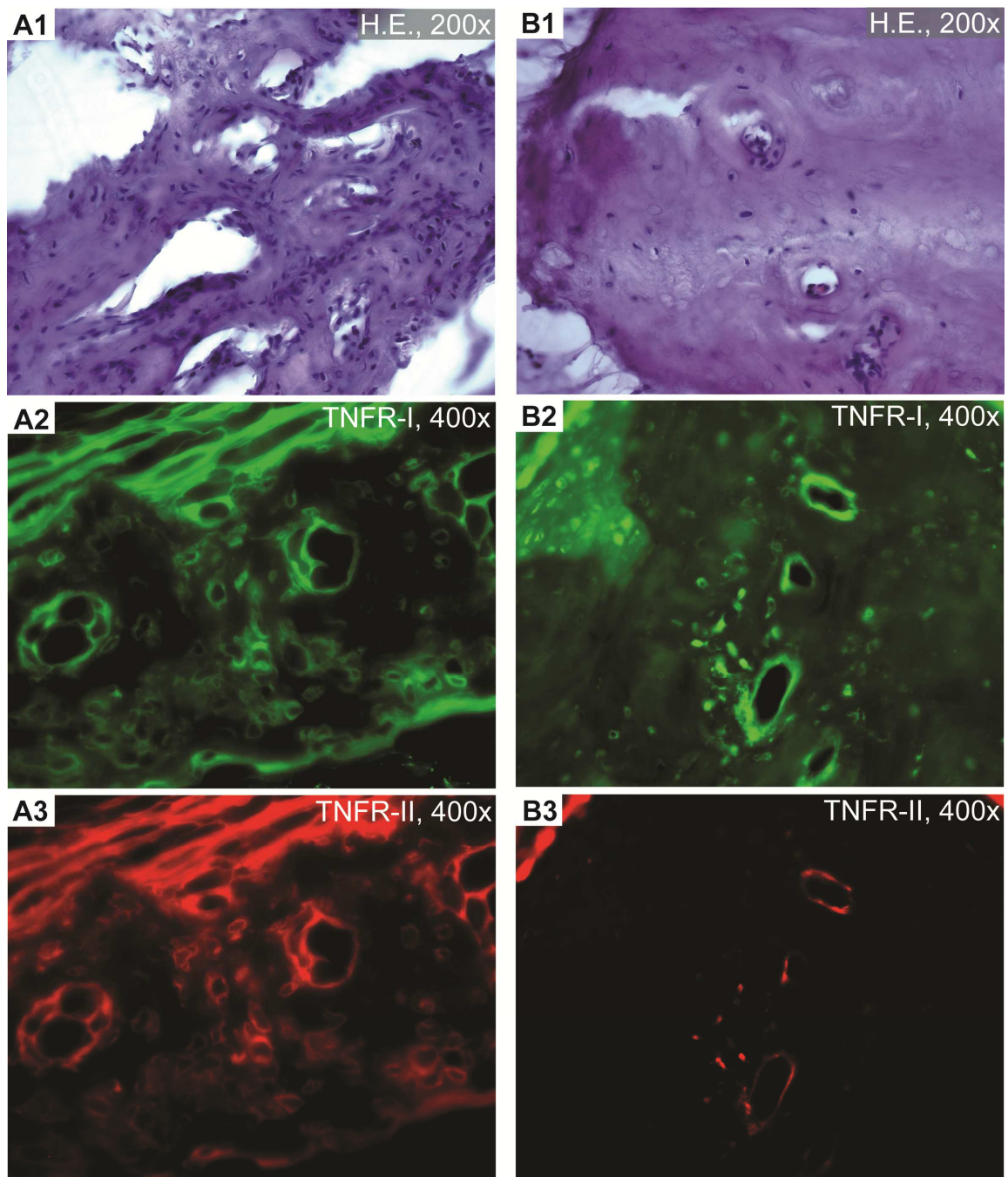
**5. Táblázat.** Otosclerotikus stapes talpakban, csontspecifikus és pozitív kontroll mintákban a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer fehérje tagjainak és a TNF- $\alpha$  receptorok (I és II) immunreakciója.

<i>Minták (n=40)</i>	<i>Renin<sup>1</sup></i>	<i>AT-II<sup>2</sup></i>	<i>ACE<sup>3</sup></i>	<i>AT-IIR<sup>4</sup></i>	<i>TNFR-I<sup>5</sup></i>	<i>TNFR-II<sup>6</sup></i>
<b>Otosclerotikus stapes (n=20)</b>						
<i>Aktív otosclerosis (n=13)</i>	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	+++ (58.7)	++ (49.8)
<i>Inaktív otosclerosis (n=7)</i>	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	+++ (23.5)	-/+ (2.1)
<b>Kortikális csont (n=10)</b>	++ (18.9)	+ (15.6)	+ (24.8)	+ (27.1)	n.a. <sup>7</sup>	n.a.
<b>Human vese minták (n=10)</b>	++++ (284.7)	+++ (193.3)	+++ (311.2)	+++ (201.8)	n.a.	n.a.

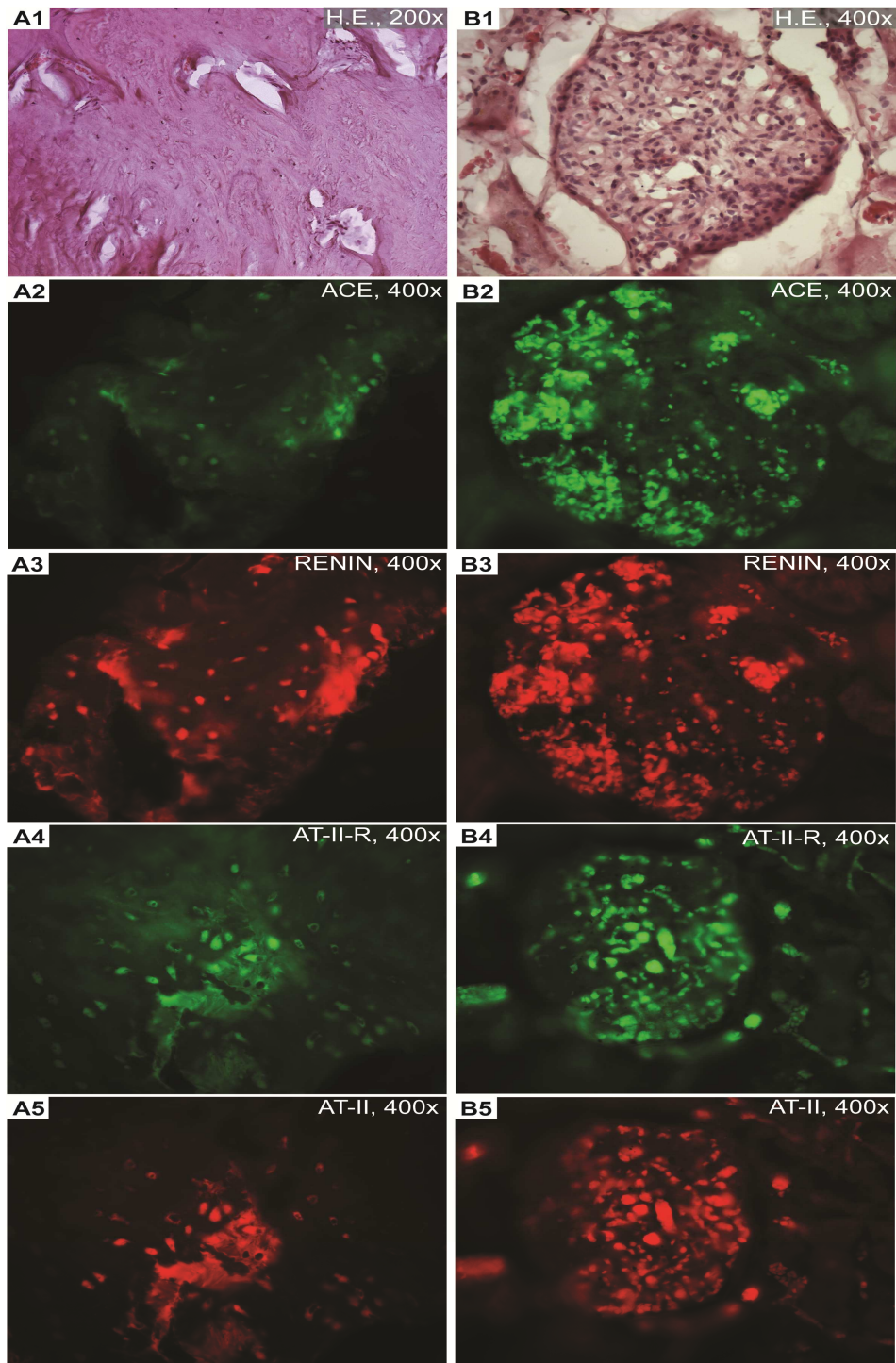
<sup>1</sup>**Az immunfluoreszcens próbák intenzitása (IFA):** + gyenge gyűrűszerű immunreaktivitás; ++ gyenge homogén immunreaktivitás; +++ erős homogén vagy gyenge szemcsézett immunreaktivitás; ++++ erős konfluáló és masszív szemcsézett reakció; - negatív reakció. A számok az immunreaktív sejtek mennyiségét jelzik 10 nagy nagyítású mező (400x) átlagában. <sup>2</sup>**AT-II:** Angiotenzin-II, <sup>3</sup>**ACE:** Angiotenzin konvertáló enzim, <sup>4</sup>**AT-IIR:** Angiotenzin-II receptor, <sup>5</sup>**TNFR-I:** Tumor necrosis factor- $\alpha$  I-es típusú receptor, <sup>6</sup>**TNFR-II:** Tumor necrosis factor- $\alpha$  II-es típusú receptor, <sup>7</sup>**n.a.:** Nem áll rendelkezésre



**33. ábra** A RAAS expressziójának immunfluoreszcens demonstrációja otosclerotikus stapes talpakban. **A1:** A stapes talp elülső pólusában elhelyezkedő aktív otosclerotikus góc hipocelluláris oszteoiddal és számos oszteolítikus lakúnával (HE, jobb fül). **A2:** Az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) negatív immunfluoreszcens reakciója. **A3:** Az előző metszet reninspecifikus immunfluoreszcens próbája. Az otosclerotikus fókuszban immunreakció nem figyelhető meg. **A4:** Az angiotenzin II receptor (AT IIR) immunreakciója szintén negatívnak bizonyult. **A5:** Az angiotenzin II-specifikus immunreakció is negatív eredménnyel zárult. **B1:** A stapes talp elülső pólusában kialakult inaktív otosclerotikus fókusz (HE, jobb fül). A léziót komoly hipocellularitás, „üres halo” sejtek és tág pszeudovaszkuláris oszteolítikus lakúnák jellemzik. **B2:** Az ACE-specifikus próba negatív immunfluoreszcens reakciót mutat. **B3:** Az előző metszet reninspecifikus immunfluoreszcens festése, mely szinte teljes mértékben reakciómentes. **B4:** Az AT IIR immunfestése szintén reakciómentes. **B5:** Az AT II-specifikus immunreakció negatív eredményt mutat.



**34. ábra** A TNFR-I/II immunfluoreszcens megjelenése otosclerosisban. **A1:** Az otosclerosis aktív stádiuma (HE). **A2:** A léziót alkotó sejtek erőteljes annuláris TNFR-I-specifikus immunreakciója. **A3:** A TNFR-II meglehetősen hasonló mintázatú reakciója. **B1:** Inaktív otosclerotikus fókusz (HE). **B2:** Az előző metszet gyenge annuláris TNFR-I-specifikus immunreakciója ábrázolódik. **B3:** A TNFR-II immunfestése gyakorlatilag negatív.

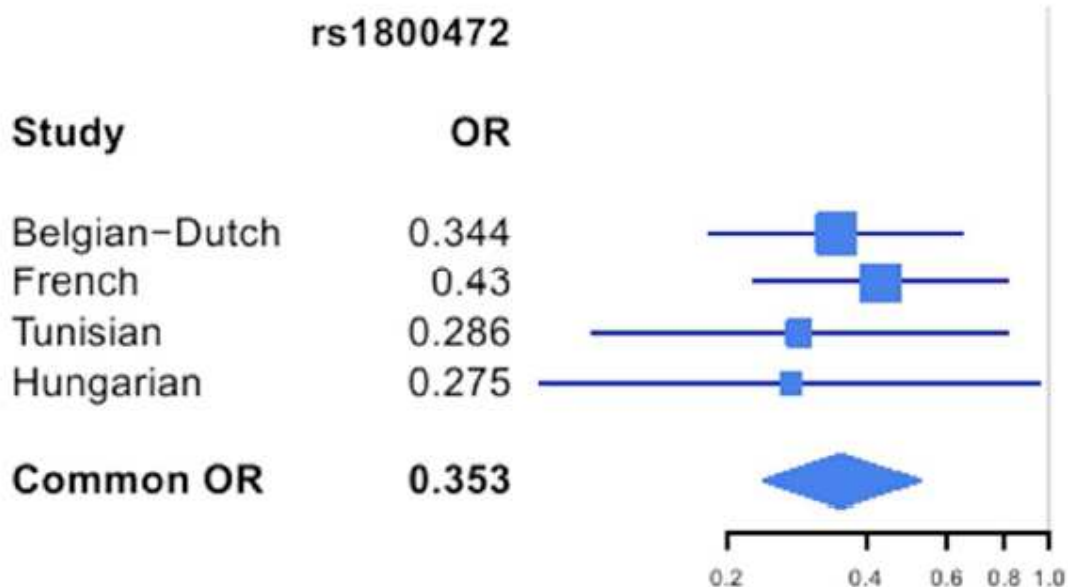


**35. ábra** A RAAS immunfluoreszcens bemutatása csontspecifikus kontrollokban és humán vesemintákban. **A1:** A kortikális csont normál struktúrájú cement vonalakat és ereket ábrázol (HE, jobb fül). **A2:** Angiotenzin konvertáló enzim (ACE) gyenge pozitív immunreakciót mutat a perivaszkuláris oszteoid progenitor sejtekben. **A3:** A korábbi metszet reninspecifikus immunreakciója meglehetősen hasonló mintázattal. **A4:** Az angiotenzin II receptor (AT IIR) immunfestése pozitív reakcióval. **A5:** Angiotenzin II (AT II) szintén pozitív reakciót ábrázol. **B1:** A humán vesekéregben elhelyezkedő glomerulus szövettani reprezentációja (HE). **B2:** Az ACE pozitív immunfluoreszcens reakcióval jár. **B3:** A korábbi metszet reninspecifikus immunfluoreszcens próbája. Az epitheliális sejtek erőteljes renin expressziót reprezentálnak. **B4:** Az AT IIR szintén pozitív reakciót mutat. **B5:** AT II-specifikus pozitív immunreakció.

#### 5.4. Asszociációs tanulmány

Összesen 153 válogatott ankylotikus stapes talpat ( $n=153$ ) dolgoztunk fel HE festéssel, melyek szövettani diagnózisa otosclerosisnak bizonyult. A vizsgálatban részt vevő stapes talpak egyetlen otosclerotikus gócot tartalmaztak, melyek közül 102 aktívnek és 51 inaktívnek mutatkozott. Az otosclerotikus fókuszok az elülső pólusban ( $n=98$ ), bipolárisan ( $n=31$ ) és az ovális ablakot obliteráló ( $n=24$ ) módon fordultak elő.

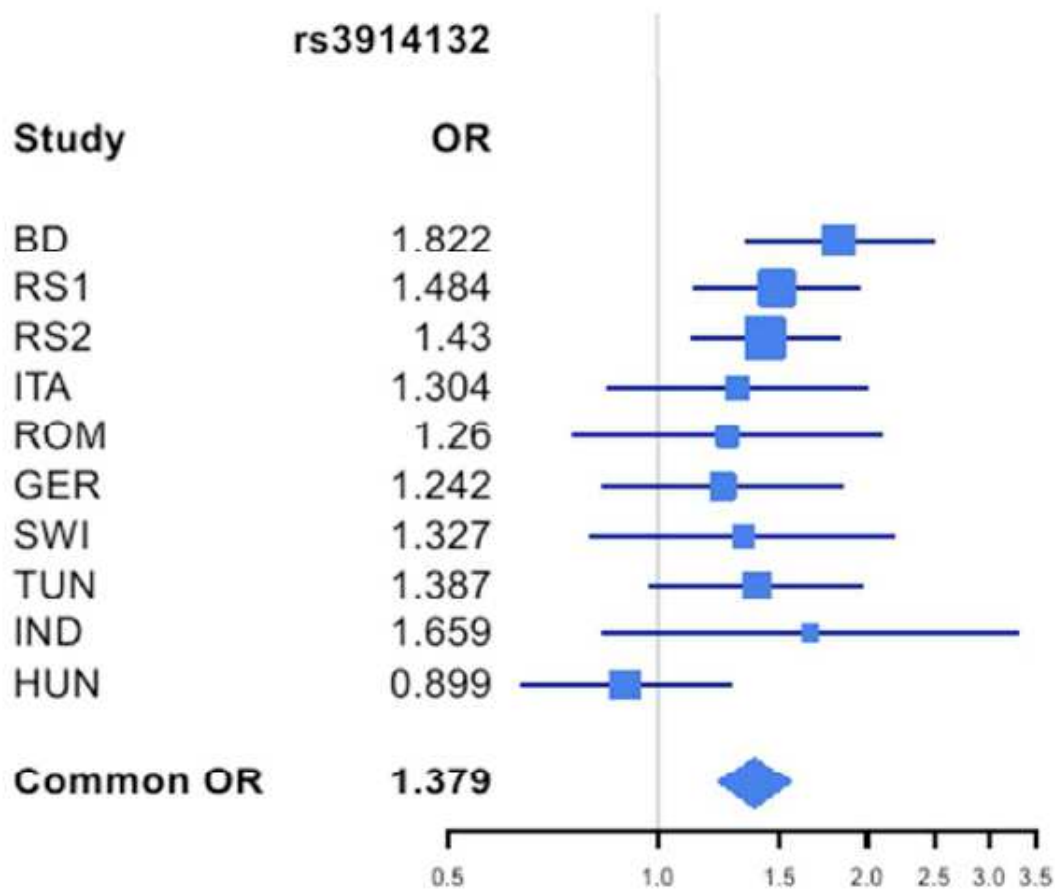
Korábbi tanulmányok eredményei alapján leírt 13 otosclerosis-specifikus SNP-t genotípezáltunk 153 otosclerosisos és 300 klinikai kontroll mintában. Az aktív és inaktív otosclerosisban szenvedő betegek értékeit hasonlítottuk a kontrollokban kiszámolt asszociációs szintekhez. Az aktív és az inaktív otosclerosisos csoportot egyben (nem szeparálva) vizsgáltuk, hogy elkerüljük a meta-analízis szignifikancia erejének drasztikus csökkenését. A minták szignifikáns SNP asszociációt kimutató, becsült statisztikai ereje (statistical power) 16% és 80,5% között mozgott. A korábban kiszámított Hardy-Weinberg equilibrium értékeitől egyetlen SNP sem mutatott deviációt. A logisztikus regressziós vizsgálattal végzett asszociációs számítás egy SNP (rs1800472, TGFB1) esetén mutatott



**36. ábra** A TGFB1 rs1800472 SNP eloszlásának meta-analízise (forest-plot diagram). A pont a felsorolt populációk odds ratio (OR) értékeit mutatja. A különböző tanulmányok 95%-os konfidencia intervallumait vízszintes vonal jelöli, a becsült értékeket négyzettel ábrázoljuk. A négyzetek magassága fordítottan arányos a becsült standard hibával. Az átlagos OR-t a rombusz jelöli, mely horizontális kiterjedése a konfidencia határokat mutatja. A rombuszok szélessége fordítottan arányos a standard hibával.

statisztikailag szignifikáns összefüggést az otosclerosissal.

Régebbi tanulmányok már beszámoltak az rs1800472 (T263I) és az otosclerosis közötti szignifikáns asszociációról (szövetteni vizsgálat nem történt) belga-holland, francia és tunéziai populációban (17,35). A korábbi összefüggések ellenőrzése céljából magyar beteganyagon is genetikai meta-analízist végeztünk (36. ábra). A meta-analízisünk eredményei arra utalnak, hogy a magyar populáció allélikus hatáserőssége megfelel a többi népcsoporténak ( $p=4.474 \times 10^{-9}$ ; OR, 0.345 [SD=0,236-0,505]). A RELN rs3914132 SNP-re vonatkozó meta-analízis adatokat a 37. ábra szemlélteti.



**37. ábra** A RELN rs3914132 SNP eloszlásának meta-analízise (forest-plot diagram). Az ábrán szereplő populációk RELN SNP meta-analízisének eredményei a korábbi RELN asszociációs tanulmányok alapján, kivéve a magyar populációt.

## 6. MEGBESZÉLÉS

Célkitűzéseinknek megfelelően lehetőségünk nyílt otosclerosisos és nem-otosclerosisos stapes minták tanulmányozására több szempont alapján (COL1A1/A2-, BMP-, RAAS expresszió, genetikai asszociációs vizsgálatok). A szerteágazó vizsgálat sorozatunkból is látszik a betegség komplex etiopatomechanizmusa. Az otosclerosisétől eltérő etiológiával jellemzett nem-otosclerosisos stapes fixációk megfelelő kontrollnak bizonyultak vizsgálataink során. Kutatócsoportunk korábbi eredményei tisztázták az otosclerosis és az egyéb stapes fixációk közötti jelentős különbségeket, melyek alapján hagyományos hematoxin-eozin festéssel differenciálhatóak el leglátványosabban egymástól. Ez a szövettani festési eljárás a mai napig kulcsfontosságú a korrekt differenciáldiagnózis felállításában.

Korábbi fejezeteinkben részletesen beszámoltunk az I-es típusú kollagén A1 és A2 alléljeinek lehetséges szerepéről az otosclerosis patogenezisében. Az irodalmi adatokban klinikailag otosclerotikusnak véleményezett beteganyaggal végezték a különféle vizsgálatokat, melyeknek nagyjából 30%-a nem is otosclerotikus eredetű stapes fixáció volt<sup>75,77</sup>. Mindez gyaníthatóan az egyszerűbb sebészi technikával magyarázható, mivel a stapedotomia nem alkalmas módszer a fixációt okozó lézió kinyerésére. Tanulmányunk egyik biostatistikai erőssége, hogy szövettanilag megerősített otosclerotikus stapes talpak elemzése alapján tettük észrevételeinket.

Normális COL1A1/A2 allél expressziót detektáltunk otosclerotikus és nem-otosclerotikus stapes fixációkban, melyek expressziós szintje és mintázata egészen hasonlóknak bizonyult, mint a negatív kontroll csontoké. Megállapításaink szerint az I-es típusú kollagén-specifikus immunreakció pozitivitása független a különböző típusú stapes fixációk szövettani diagnózisától, ellenben szoros összefüggést mutatott az oszteoid mátrix cellularitásával. Az aktív otosclerotikus fókuszok intenzív kollagén-specifikus immunreakciót reprezentáltak, míg az érett és jól differenciált csontban, ahol a remodelling majdnem teljesen hiányzik, alacsony  $\alpha$ -1 és  $\alpha$ -2 lánc expresszió volt megfigyelhető<sup>74</sup>. Immunfluoreszcens protokollunk egyedül a normális  $\alpha$  láncokat képes kimutatni, ezért az emelkedett kollagén expressziót patológiás variánsok nem befolyásolták. Azonban a kísérlet második részében alkalmazott RT-PCR az A1 és A2 allélek normális és patológiás mRNS transzkripció variánsait is képesek detektálni. Az immunfluoreszcens és a PCR vizsgálataink eredményei összecsengtek, ugyanis csak vad (normális) típusú COL1A1 és COL1A2 mRNS

szekvenciákat szolgáltatottak. Eredményeink fényében kijelenthető, hogy mind az otosclerotikus és a nem-otosclerotikus stapes fixációk az I-es típusú kollagén normális  $\alpha$ -1 és  $\alpha$ -2 lánc expressziójával jellemezhetőek. Ebből úgy gondoljuk, hogy az otosclerosis nem képzelhető el enyhe lefolyású vagy lokalizált oszteogenezis imperfektaként, avagy oszteoporózisként. Mivel a kollagén az otosclerosis szövettani diagnózisától és más stapes rendellenességtől függetlenül expresszálódott, ezáltal nem tudtuk megerősíteni a betegséggel való feltételezett összefüggést<sup>74</sup>.

Az I-es típusú kollagén egy evolúcionálisan igen konzervatív struktúr fehérje, amelynek mutációi a csontváz rendszer megannyi szisztémás rendellenességéhez vezetnek<sup>102</sup>. Ráadásul a sejtekben végbemenő transzkripció, az mRNS splicing és a fehérje transláció témérdek szabályzó mechanizmusának bármely zavara akadályozza az A1 és A2 allélek normális expresszióját<sup>103</sup>. Az otosclerosis kollagén-hipotézisét propagáló korábbi publikációk képtelenek magyarázni a betegség organotropizmusát, azaz a humán otikus kapszulára történő kizárólagos lokalizációt<sup>2,69</sup>. Másrésről az otosclerosis oszteogenezis imperfekta-hipotézise nem támasztható alá kizárólag genetikai tanulmányokkal<sup>104</sup>. A COL1A1 gén polimorfizmusok és mutációk összefüggést mutatnak az otosclerosisral, azonban a legtöbb klinikai otosclerotikus beteg kapcsolatban állhat más genetikai faktorokkal is<sup>2,69,104</sup>. Vizsgálataink alapján a COL1A1 és COL1A2 allél mutációi és SNP-i feltehetőleg hozzájárulnak az otosclerosis patogeneziséhez, azonban nem gátolják az I-es típusú kollagén expresszióját.

Korábban aprólékosan kifejtettük a BMP fehérjék részvételét az aktív otosclerosis kóros újsontképződéssel járó stádiumában. Vizsgálatunkkal kapcsolatban ugyancsak ki kell térnünk arra a lényeges különbségre, miképp a hozzáférhető irodalmi adatokban kizárólag klinikai otosclerotikus beteganyagot vettek górcső alá az előzőekben már részletezett nehézségek miatt. Jelen tanulmányunkban szövettanilag igazolt otosclerotikus stapes talpokban sikerült emelkedett BMP 2, 4, 5 és 7 expressziót kimutatni, míg a nem-otosclerotikus és kontroll csoportban hasonló eltérést nem azonosítottunk<sup>3</sup>. Továbbá megerősítettük *Lehnerdt és mtsai* azon feltételezését, miszerint a BMP 2, 4 és 7 kiváltó faktor a betegség patogenezisében, amelyek megnövekedett expressziója szerepet játszik az otosclerotikus csontátépülésben<sup>78</sup>. Mindemellet jelen tudásunk szerint tanulmányunk az első, mely bizonyítja a BMP 5 funkcióját az otosclerosis etiopatogenezisében.

Kutatócsoportunk által felállított etiopatogenetikai modell elősegíti az embrionális kondrocita reaktiváció hipotézisének magyarázatát, miként az otikus kapszula középső

rétegében nyugvó embrionális kondrociták feltehetőleg kanyaróvírus infekcióra történő aktivációja lenne az otosclerotikus fókusz kiindulópontja<sup>69,71</sup>. Helyüket érett oszteoklasztok és oszteoblasztok veszik át, melyek jelentős mennyiségű TNF- $\alpha$ -t, CD51/61-t, apoptózis inhibitorokat és különféle BMP-eket expresszálnak. Ezen BMP-k precíz leírása nélkülözhetetlen a betegség kifejlődésének megértéséhez<sup>69,78,96</sup>.

A közelmúltban több tanulmány foglalkozott a RAAS gének SNP-inek és az otosclerosisnak a lehetséges összefüggésével, emiatt vizsgáltuk a RAAS négy elemének (renin, ACE, AT-II és AT-IIR) expressziós szintjeit és mintázatát szövettanilag alátámasztott otosclerotikus stapes talpakban. Pozitív kontrollként használt cadaver humán vese szövetben és szövetspecifikus kontroll csontjainkban intenzív RAAS-specifikus immunreakciót detektáltunk, azonban sem az aktív, sem az inaktív otosclerotikus góciókban lévő sejtek nem adtak RAAS-specifikus pozitív immunreakciót<sup>83</sup>.

Észrevételeink korántsem meglepőek, ugyanis RAAS expressziót eddig egyedülálló módon parenchimás szervekben, neurális szövetekben, vaszkuláris elemekben és vese mintákban találtak<sup>105,106</sup>. Ezzel szemben szignifikáns renin, ACE, AT-II és AT-IIR expressziót figyeltünk meg csontspecifikus kontrollként alkalmazott kortikális csontfragmentumok perivaszkuláris oszteoid progenitor sejtjeiben<sup>107</sup>, amelyek alátámaszthatják a csontvelő asszociált RAAS szerepét a lokális csontforgalom regulációjában<sup>108,109</sup>. A stapes talpak és a kortikális csontok RAAS expressziója körüli ellentmondások a humán otikus kapszula embrionális eredetével és egyedülálló metabolikus tulajdonságaival magyarázható<sup>2,69</sup>. Ezen kívül a RAA jelátviteli útvonal egyik végterméke, az aldosteron, is befolyásolhatja az otosclerosis lefolyását feszültség-függő kalcium csatornák szabályozása által<sup>108,109</sup>.

Elsőként *Imauchi és mtsai* szignifikáns összefüggésről tudósítottak klinikai otosclerosis ( $n=186$ ) és az AGT M235T, valamint az ACE I/D polimorfizmusok között, ezenfelül az ACE TT és DD genotípus nagyobb arányban fordult elő stapes fixációs eseteikben, mint a kontroll csoportban<sup>110</sup>. Később *Schrauwen és mtsai* nagy elemszámú populációt ( $n=692$ ) érintő tanulmányukban elvetették a korábban vélelmezett kapcsolatot az otosclerosis és az ACE I/D és az AGT M235T között<sup>91</sup>. Eredményeink alapján kutatócsoportunk sem tudja alátámasztani az előzőekben felvetett kapcsolatot a RAAS és az otosclerosis között, mivel szövettanilag igazolt otosclerotikus stapes talpakban RAAS expresszió nem volt detektálható<sup>83</sup>. Ezen adatoktól függetlenül, azonban izgalmas lenne ACE-

inhibitorokkal vagy AT-receptor blokkolókkal kezelt vagy éppen nem kezelt, egyszerre magasvérnyomás betegségben és otosclerosisban szenvedő betegek audiológiai és radiológiai prospektív követése, hogy megállapíthassuk ezen gyógyszercsoport terápiás hatékonyságát.

Genetikai asszociációs tanulmányunkban klinikailag és szövettanilag igazolt magyar otosclerotikus betegek vettek részt. Az otosclerosis diagnózisa a sebészeti beavatkozás során megállapított stapes fixáció és az aktív és inaktív fókuszok szövettani verifikálása alapján ment végbe. A COL1A1, TGF- $\beta$ 1, BMP2, BMP4, AGT és RELN génekkel genetikai asszociációs tanulmányt végeztünk, azzal a céllal, hogy azonosítsuk a hajlamosító gént.

A TGF- $\beta$ 1 gén szerepét humán otosclerosis stapediális expressziója miatt vetették fel az otikus kapszula csontforgalmában<sup>111</sup>, majd ennek következtében involválódott a TGF- $\beta$ 1 az otosclerosis patogenezisébe. A TGF- $\beta$ 1 e szerepkörbe való belekeveredése miatt intenzív kutatások indultak, melyek hozományaképpen kimutatták az rs1800472 SNP-t (T263I aminosav változást idéz elő), ami belga-holland, francia és tunéziai populációkban összefüggést mutatott az otosclerosissal<sup>96,112</sup>. Tanulmányunkban a két genotípiázott SNP (rs8179181 és rs1800472) közül statisztikailag szignifikáns összefüggést csak a T263I (rs1800472) variánssal tudtunk kimutatni klinikai és szövettanilag megerősített otosclerosisban. Továbbá az rs1800472 SNP-re vonatkoztatva egy meta-analízist folytattunk le a korábban publikált adatok alapján<sup>96,112</sup>, mely szemlélteti az asszociáció ismételt jelenlétét a klinikailag és szövettanilag is igazoltan otosclerosisos magyar populációban. Utóbbi nagyjából megegyezik a szövettanilag nem-igazolt populáció adataival. Mindez megerősíti a kapcsolatot a T263I variáns és az otosclerosis között.

Az általunk tanulmányozott többi gén mind ugyanolyan összefüggést mutatott, mint a szövettani vizsgálaton át nem esett klinikai otosclerotikusnak véleményezettek. A COL1A1 génnel folytatott asszociációs tanulmányok (európai, amerikai, tunéziai) a spanyol populációt kivéve, kapcsolatot mutattak az otosclerosissal<sup>75,97,101,113</sup>. A BMP2 és BMP4 géneket célzó asszociációs vizsgálatok két SNP-vel (rs3178250 és rs17563) kapcsolatban tártak fel összefüggéseket az SNP-k és az otosclerosis között belga-holland, valamint francia populációban<sup>28</sup>. Mindemellett a tunéziai populációban nem tudtak kapcsolatot kimutatni a vizsgálat diagnosztikus erejének alacsony mivolta miatt<sup>112</sup>. 2008-ban az AGT-re nézve *Imauchi és mtsai* tártak fel összefüggést az rs699 AGT és az otosclerosis között francia populációban<sup>110</sup>. Egy évvel később *Schrauwen és mtsai* nem tudtak kapcsolatot kimutatni belga-holland populációban<sup>91</sup>. A RELN volt az egyetlen gén, melyet egy teljes genomot

analizáló asszociációs tanulmányban identifikáltak<sup>82</sup>. Mindeztidáig a RELN és az otosclerosis között meglévő összefüggés a legerősebb és legmeggyőzőbb<sup>38,101</sup>. Jelen tanulmányunkban genotívizáltuk a COL1A1 gén két SNP-jét (rs2586498 és rs1800012), a BMP2 és BMP4 egy-egy SNP-jét (rs3178250 és rs17563), a RELN hat SNP-jét (rs2299383, rs3914132, rs39335, rs39350, rs39374 és rs39395) és az AGT egy SNP-jét (rs699). Ezen gének (COL1A1, BMP2, BMP4, RELN, AGT) SNP-i közül egyik sem volt összefüggésbe hozható a klinikai és szövettanilag igazolt otosclerotikus magyar populációval. Több lehetséges tényező merült fel ezen SNP-k nem megismételhető betegség-asszociációjának magyarázatára. Elsősorban elképzelhető, hogy a vizsgált SNP-k ereje és hatásuk erőssége a magas mintaszám miatt már kellően lecsökkent ahhoz, hogy bármely asszociációt észleljünk a célpopulációban. Második lehetséges magyarázatként felmerül, hogy a kezdeti asszociációkra vonatkozó megállapítások fals pozitívak. A harmadik értelmezés szerint az otosclerosis klinikailag heterogén, több endofenotípussal rendelkezik, melyek mindegyike különböző molekuláris alapokkal bír. A negyedik, a populációkon átívelő „nonreplikáció” lehet, amely a különböző környezeti kockázati tényezők vagy epigenetikai faktorok expozíciójának következménye lehet. A BMP2 rs3178250 és a BMP4 rs17563 ereje alacsony, mindössze 26,5% és 27,1%, így ezen gének asszociációjáról nem tudunk konklúziót levonni tanulmányunkban. A COL1A1 rs2586498 SNP-jének ugyancsak igen korlátozott a diagnosztikus ereje, következésképpen messzemenő következtetéseket szintén nem vonhatunk le. Másrészt, a COL1A1 rs180012 diagnosztikus ereje elérte a 73.9%-ot és emellett sem találtunk összefüggést a betegséggel. Az AGT rs699 SNP-jének ereje 80.5%-nak bizonyult, azonban itt sem tudtunk asszociációt detektálni. Ezek alapján a COL1A1-ről és az AGT-ről megállapítható, hogy a jelenleg kimutatott negatív eredmények a kezdeti tanulmányokban valószínűleg a hatás túlbecsülésének vagy fals pozitív értékeknek tudható be. Az a tény, miszerint a korábbi vizsgálatok ellentmondásos eredményekről számoltak be az előbb említett két génnel kapcsolatban, összhangban áll ezzel a hipotézissel<sup>74,91,113</sup>. Továbbá a RELN SNP-iben sem találtunk genetikai asszociációt. Ez is meglehetősen váratlan fordulatnak bizonyult, ugyanis számos független populációban is markáns megismétlődést mutatott az ezt megelőző tanulmányokban<sup>82,100,101</sup>. Habár a RELN egyes SNP-inek tekintélyes a diagnosztikus ereje (74.4% felett), mégis figyelembe kellett vennünk az erős kapcsolati aránytalanságot az SNP-k között. Dacára ennek a nézőpontnak, ezek az SNP-k a korábban publikált asszociációk replikációjának magas diagnosztikus erejét biztosítják. Ezért a RELN asszociációk non-szignifikanciáját valószínűtlennek tartjuk és a

diagnosztikus erő hiányának tekintjük. Egy további érv a meta-analízis eredménye, melyet „forest-plot” diagramon jelenítettünk meg. Másik szövettanilag nem igazolt otosclerosis populációkon a korábban publikált RELN asszociációs tanulmányokban a RELN asszociáció minden vizsgálatban azonosnak bizonyult, habár néhány összefüggés a kisebb elemszám miatt nem volt szignifikáns. Tanulmányunkban az „odds ratio” nagyon közel áll nullához, és az asszociáció konzekvensen nem áll párhuzamban a korábbi analízisekkel, azonban az elemszám növelésével nem valószínű, hogy szignifikáns összefüggést kapunk. Egy kézenfekvő hipotézis magyarázatul szolgálhat az eredményekre, miszerint a RELN összefügg a specifikus otosclerotikus endofenotípussal, ami valójában különbözik a jelen tanulmányba válogatott betegek szövettanilag igazolt endofenotípusától.

Összegésképpen, az otosclerosis etiopatogenetikai modelljét jelenleg úgy képzeljük, hogy perzisztáló kanyaróvírus fertőzés hatására az otikus kapszulában lévő oszteoblasztok, oszteoklasztok, fibroblasztok és endotél sejtek saját felszínükön MHC I molekulák segítségével töredezett kanyaróvírus antigéneket expresszálnak. Ez a folyamat CD8+ T-sejt függő immunválaszt vált ki, melynek hatására nagy mennyiségű TNF- $\alpha$  szabadul fel és következményes csontlebonlás indul meg<sup>18</sup>. Ezzel szimultán az otikus kapszula embrionális kondroblasztjai és oszteoblasztjai, valamint az idevándorolt oszteoklasztok reaktivációs folyamaton mennek keresztül, ugyancsak a kanyaróvírus fertőzés következtében<sup>22,71,114</sup>. Az otosclerotikus göcök oszteoklasztjai és oszteoblasztjai CD51/61 (oszteoklaszt funkcionális antigén) molekulát expresszálnak<sup>71</sup>, ráadásul megnövekedett BMP, TGF- $\beta$  és TNF- $\alpha$  expresszió mutatható ki<sup>69,78,96</sup>. Az aktivált monociták, makrofágok, T- és B-sejtek és az oszteoklasztok is képesek az oszteolítikus fókuszba TNF- $\alpha$ -t szekretálni, és ezzel továbbra is fenntartani a gyulladási eseményeket<sup>19,20</sup>.

Jelen kísérletsorozatunkkal bizonyítottuk, hogy a TGF- $\beta$ 1 rs1800472 SNP-je (T263I) szerepet játszik az otosclerosis patogenezisében. Emellett a BMP 2, 4, 5 és 7 magas szöveti expressziójuk miatt szintén nem elhanyagolhatóak, azonban véleményünk szerint ezen molekulák pusztán az oszteolítikus gyulladás helyreállító mechanizmusában vesznek részt. Továbbá, kísérletes munkánk eredményeképpen úgy gondoljuk, hogy a COL1A1, COL1A2 és a RAAS a korábbi irodalmi felvetésekkel szemben, nem játszik szerepet az otosclerosis patogenezisében.

## 7. ÚJ MEGFIGYELÉSEK

1. Otosclerotikus szövettanilag igazolt stapes talpakban nem jelenik meg a kontrolltól eltérő I-es típusú kollagén  $\alpha$ -1 és  $\alpha$ -2 lánc expresszió, emellett ugyancsak nem található RT-PCR-rel patológiás COL1A1 és COL1A2 variáns. Véleményünk szerint az I-es típusú kollagén nem felelős az otosclerosis kialakulásáért.
2. Ugyancsak otosclerotikus szövettanilag megerősített stapes talpaktól az irodalmi adatokkal megegyezően sikerült detektálnunk immunfluoreszcens vizsgálattal BMP 2, 4 és 7-et, ezenfelül elsőként számolunk be a BMP 5 fokozott expressziójáról otoscleroticus stapes talpakban. Elképzelésünk szerint a BMP-k a lítikus folyamat utáni regenerációban játszanak nélkülözhetetlen szerepet.
3. A korábbi felvetésekkel ellentétben, szövettanilag igazolt otosclerotikus stapes talpakban nem jelenik meg kimutatható RAAS expresszió, így feltételezésünk szerint a RAAS nem tehető felelőssé az otosclerosis kifejlődéséért.
4. Nemzetközi összefogásban, elsőként párosítottunk asszociációs tanulmányhoz szövettanilag megerősített stapes talpakot, melyek alapján a vizsgálat SNP-ekből úgy tűnik, hogy a TGF- $\beta$ 1 mutációja szerepet játszik az otosclerosis etiopatogenezisében.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az otosclerosis az emberi temporális csont (otikus kapszula) egyedülálló, gyulladással járó csontanyagcsere megbetegedése. A betegség etiológiája mindmáig ismeretlen, így jelenleg is intenzív kutatások folynak. Az otosclerosis patogenetikai tényezői között komoly figyelem fordult az I-es típusú kollagén A1 (COL1A1) és A2 (COL1A2) alléljére (lokalizált oszteogenezis imperfekta hipotézis), a BMP-k és a TGF- $\beta$ 1 fehérjék lehetséges eltéréseire. Továbbá, több szerző vetette fel a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) kapcsolatát az otosclerosis kialakulásával összefüggésben. Klinikailag stapes fixációban (ankylosis) szenvedő betegek stapedectomiája során eltávolított stapes mintákat és kontroll szöveteket tanulmányoztunk hematoxilin-eozin festéssel, immunfluoreszcens próbával (COL1A1, COL1A2, BMP 2, 4, 5, 7, RAAS), RT-PCR-rel (COL1A1, COL1A2) és asszociációs vizsgálattal. Eredményeink alapján nem találtunk összefüggést otosclerosisos stapes talpak COL1A1, COL1A2 és RAAS expressziós mintázatban, azonban szignifikáns expresszió fokozódást mutattunk ki a BMP 2, 4, 5 és 7 fehérjékben. Ezenfelül, RT-PCR vizsgálattal sem tudtunk patológiás COL1A1 és COL1A2 transzkripció variánst detektálni. Asszociációs tanulmányunkban szövettanilag megerősített stapes talpak és a TGF- $\beta$ 1 között szignifikáns összefüggést mutattunk ki. Mindemellett kutatócsoportunk írta le elsőként a BMP 5 szerepét az otosclerosis patogenezisében. Eredményeink fényében egy lehetséges etiopatogenetikai modellt biztosítunk az otosclerosis megértéséhez.

## 9. SUMMARY

Otosclerosis is a unique, inflammatory disease of pathologic bone remodeling located exclusively to the human otic capsule. At present, despite of intensive research, the etiology of disease remained unclear. Among the potential pathogenetic factors of otosclerosis A1 and A2 alleles of type I collagen (localised osteogenesis imperfecta hypothesis), BMPs and TGF- $\beta$ 1 might play a considerable role. A relationship between the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and otosclerosis has also been proposed by several authors. We studied stapes samples removed by stapedectomy due to clinically stapes fixation. The further analysis was based on several comprehensive series of examinations, such as haematoxylin-eosin staining, immunofluorescent assays (COL1A1, COL1A2, BMP 2, 4, 5, 7, RAAS), RT-PCR (COL1A1, COL1A2) and genetic association study. According to our results, no correlation was found in the expression pattern of COL1A1, COL1A2 and RAAS in the otosclerotic stapes footplates, however; a significantly elevated expression was detectable in case of BMP 2, 4, 5 and 7. In addition, we could not demonstrate pathologic transcription variants of COL1A1 and COL1A2 with RT-PCR. In the genetic association study, a statistically significant correlation was observed between histologically confirmed otosclerotic stapes footplates and TGF- $\beta$ 1. Nevertheless, the role of BMP 5 in the pathogenesis of otosclerosis was first described by our scientific group. In the light of these results, we have been provided a potential etiopathogenetic model for otosclerosis.

## **10. TÁRGYSZAVAK**

Csontremodellációs betegség, otosclerosis, patogenezis, COL1A1, COL1A2, BMP, RAAS, TGF- $\beta$ 1

## **11. KEYWORDS**

Bone remodeling disease, otosclerosis, pathogenesis, COL1A1, COL1A2, BMP, RAAS, TGF- $\beta$ 1

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. med. habil. Karosi Tamás Főorvos Úrnak, hogy lehetőséget adott számomra kutatócsoportjában. Időt és fáradságot nem kímélve vezetett be a tudományos világba és mindvégig precízen irányította kutatásaimat. Igényes szemléletével segített eligazodni az experimentális tudományok területén és megtanított gondolataim interpretálására nemzetközi folyóiratokban.

Köszönöm édesapámnak, Dr. Liktör Bálint Főorvos Úrnak, hogy fül-orr-gégészeti pályámon elindított, következetességével és rendkívüli szakmai felkészültségével igazi „alma mater”-t teremtett, melyben én is részt vehettem. Nem csak a fülsebészet alapjait sajátíthattam el Tőle, hanem bevezetett a stapes sebészet kivételes világába is.

Ugyancsak köszönettel tartozom munkatársamnak, Dr. Csomor Péternek, aki áldozatos módon segített eligazodni a laborban és megtanított a szövettani metszetek elkészítésére.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném köszönetemet kifejezni családom minden tagjának, irányomba tanúsított türelméért és segítőkészségéért.

Tanulmányaink az OTKA PD75371, K81480, DEOEC Mec 17/2008, TÁMOP4.2.1B pályázatok finansziális segítségével készülhetett el.

### 13. IRODALOMJEGYZÉK

1. Wiet RJ, Causse JB. Otosclerosis (otospongiosis). *Published by American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation, Inc.*,1991.
2. Karosi T, Szekanecz Z, Sziklai I. Otosclerosis: an autoimmune disease? *Autoimmun Rev* 2009;9(2):95-101.
3. 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 Otolaryngologica*, 2012; 132(6):624-631.
4. Sziklai I, Batta TJ, Karosi T. Otosclerosis: an organ-specific inflammatory disease with sensorineural hearing loss. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009;266(11):1711-18.
5. Liktör B. Diplomamunka: A  $Ca^{2+}$  jelátvitel a Corti-féle szerv sejtjeiben. 2009.
6. Funnell WR, Laszlo CA. Modeling of the cat eardrum as a thin shell using the finite-element method. *J Acoust Soc Am* 1978; 63(5): 1461-67.
7. Neudert M, Berner M, Bornitz M, Beleites T, Ney M, Zahnert T. Osseointegration of prostheses on the stapes footplate: evaluation of the biomechanical feasibility by using a finite element model. *J Assoc Res Otolaryngol* 2007; 8(4): 411-21.
8. Chou CF, Yu JF, Chen CK. The natural vibration characteristics of human ossicles. *Chang Gung Med* 2011; 34(2): 160-65.
9. Böhnke F, Arnold W. Finite element model of the stapes – inner ear interface. *Adv Otorhinolaryngol* 2007; 65: 150-54.
10. Karosi T, Kónya J, Petkó M, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J, Sziklai I. Two subgroups of stapes fixation: otosclerosis and pseudo-otosclerosis. *Laryngoscope* 2005; 115:1968-73.
11. Niedermeyer HP, Hausler R, Schwub D, Neuner NT, Busch R, Arnold W. Evidence of increased average age of patients with otosclerosis. *Adv Otorhinolaryngol* 2007; 65: 17-24.
12. Markou K, Goudakos J. An overview of the etiology of otosclerosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009; 266(1): 25-35.
13. Liktör B, Szekanecz Z, Batta JT, Sziklai I, Karosi T. Perspectives of pharmacological treatment of otosclerosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013; 270(3):793-804.
14. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289(5484):1504-08.

15. Zehnder AF, Kristiansen AG, Adams JC, Merchant SN, McKenna MJ. Osteoprotegerin in the inner ear may inhibit bone remodeling in the otic capsule. *Laryngoscope* 2005;115(1):172-7.
16. Karosi T, Jokay I, Konya J, Szabo LZ, Pytel J, Jori J, et al. Detection of osteoprotegerin and TNF- $\alpha$  mRNA in ankylotic Stapes footplates in connection with measles virus positivity. *Laryngoscope* 2006;116(8):1427-33.
17. Brookler K. Medical treatment of otosclerosis: rationale for use of bisphosphonates. *Int Tinnitus J* 2008;14(2):92-6.
18. Karosi T, Konya J, Petko M, Szabo LZ, Pytel J, Jori J, et al. Antimeasles immunoglobulin g for serologic diagnosis of otosclerotic hearing loss. *Laryngoscope* 2006; 116(3):488-93.
19. Karosi T, Konya J, Petko M, Sziklai I. Histologic otosclerosis is associated with the presence of measles virus in the stapes footplate. *Otol Neurotol* 2005;26(6):1128-33.
20. Karosi T, Konya J, Szabo LZ, Pytel J, Jori J, Szalmas A, et al. Codetection of measles virus and tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA in otosclerotic stapes footplates. *Laryngoscope* 2005;115(7):1291-97.
21. Karosi T, Csomor P, Szalmas A, Konya J, Petko M, Sziklai I. Osteoprotegerin expression and sensitivity in otosclerosis with different histological activity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011;268(3):357-65.
22. Csomor P, Sziklai I, Liktor B, Szabo L, Pytel J, Jori J, et al. Otosclerosis: disturbed balance between cell survival and apoptosis. *Otol Neurotol* 2010;31(6):867-74.
23. Ribari O, Sziklai I. Cathepsin D activity in otosclerotic bone and perilymph. *Acta Otolaryngol* 1988;105(5-6):549-52.
24. Schett G, Zwerina J, David JP. The role of Wnt proteins in arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4(9):473-80.
25. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007;13(2):156-63.
26. Kanaan RA, Kanaan LA. Transforming growth factor beta1, bone connection. *Med Sci Monit* 2006;12(8):164-69.
27. Szekanecz Z, Szekanecz E, Morvai K, Racz T, Szegedi G, Sziklai I. Current aspects of the pathogenesis and clinical characteristics of otosclerosis: possibilities of drug therapy. *Orv Hetil* 1999;140(44):2435-40.

28. Schrauwen I, Thys M, Vanderstraeten K, Franssen E, Dieltjens N, Huyghe JR, Ealy M, Causters 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* 2008; 23: 507-16.
29. Schuknecht HF, Barbar W. Histologic variants in otosclerosis. *Laryngoscope* 1985; 95(11): 1307-17.
30. Uppal S, Bajaj Y, Rustom I, Coatesworth AP. Otosclerosis 1: the aetiopathogenesis of otosclerosis. *Int J Clin Pract* 2009; 63(10): 1526-30.
31. Ealy M, Smith RJ. The genetics of otosclerosis. *Hear Res* 2010; 266(1-2):70-74.
32. Thomas JP, Minovi A, Dazert S. Current aspects of etiology, diagnosis and therapy of otosclerosis. *Otolaryngol Pol* 2011; 65(3): 162-70.
33. Iro H. 84th annual meeting of the German society of Oto-Rhino-Laryngology and Head and Neck Surgery. 2013 Nuremberg Convention Center, Germany.
34. Karosi T, Csomor P, Sziklai I. The value of HRCT in stapes fixations corresponding to hearing thresholds and histologic findings. *Otol Neurotol* 2012; 33(8): 1300-07.
35. Liktor B, Révész P, Csomor P, Gerlinger I, Sziklai I, Karosi T. Diagnostic value of cone-beam CT in histologically confirmed otosclerosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013; 271(8): 2131-38.
36. Karosi T, Csomor P, Petko M, Liktor B, Szabo LZ, Pytel J, et al. Histopathology of nonotosclerotic stapes fixations. *Otol Neurotol* 2009;30(8):1058-66.
37. Redfors YD, Hellgren J, Möller C. Hearing-aid use and benefit: a long-term follow-up in patients undergoing surgery for otosclerosis. *Int J Audiol* 2013; 52(3): 194-99.
38. Schrauwen I, Van Camp G. The etiology of otosclerosis: combination of genes and environment. *Laryngoscope* 2010; 120(6): 1195-1202.
39. Bajaj Y, Uppal S, Bhatti I, Coatesworth AP. Otosclerosis 3: the surgical management of otosclerosis. *Int J Clin Pract* 2010;64(4):505-10.
40. Causse JR, Causse JB, Uriel J, Berges J, Shambaugh GE, Jr., Bretlau P. Sodium fluoride therapy. *Am J Otol* 1993;14(5):482-90.
41. Colletti V, Fiorino FG. Effect of sodium fluoride on early stages of otosclerosis. *Am J Otol* 1991;12(3):195-8.
42. Vartiainen E, Vartiainen J. The effect of drinking water fluoridation on the natural course of hearing in patients with otosclerosis. *Acta Otolaryngol* 1996;116(5):747-50.

43. Vartiainen E, Vartiainen T. Effect of drinking water fluoridation on the prevalence of otosclerosis. *J Laryngol Otol* 1997;111(1):20-2.
44. Vartiainen E, Vartiainen J. The influence of fluoridation of drinking water on the long-term hearing results of stapedectomy. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1997;22(1):34-6.
45. Bretlau P, Causse J, Causse JB, Hansen HJ, Johnsen NJ, Salomon G. Otospongiosis and sodium fluoride. A blind experimental and clinical evaluation of the effect of sodium fluoride treatment in patients with otospongiosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1985;94(2 Pt 1):103-7.
46. 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* 1989;10(1):20-2.
47. Papapetrou PD. Bisphosphonate-associated adverse events. *Hormones (Athens)* 2009;8(2):96-110.
48. Kennedy DW, Hoffer ME, Holliday M. The effects of etidronate disodium on progressive hearing loss from otosclerosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;109(3 Pt 1):461-7.
49. Yesil S, Comlekci A, Guneri A. Further hearing loss during osteoporosis treatment with etidronate. *Postgrad Med J* 1998;74(872):363-4.
50. Head KA. Ipriflavone: an important bone-building isoflavone. *Altern Med Rev* 1999;4(1):10-22.
51. Ribari O, Sziklai I. Effect of flavonoid on PGE2-induced alterations in percentage collagen synthesis in ossicle organ cultures. *Acta Otolaryngol* 1987;103(5-6):657-60.
52. Sziklai I, Ribari O. The effect of Flavone treatment on human otosclerotic ossicle organ cultures. *Arch Otorhinolaryngol* 1985;242:67-70.
53. Sziklai I, Komora V, Ribari O. Double-blind study on the effectiveness of a bioflavonoid in the control of tinnitus in otosclerosis. *Acta Chir Hung* 1992;33(1-2):101-07.
54. Brookes GB. Vitamin D deficiency and otosclerosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1985;93(3):313-21.
55. Hu L, Lind T, Sundqvist A, Jacobson A, Melhus H. Retinoic acid increases proliferation of human osteoclast progenitors and inhibits RANKL-stimulated osteoclast differentiation by suppressing RANK. *PLoS One* 2010;5(10):e13305.

56. Ruppe MD. Medications that affect calcium. *Endocr Pract* 2011;17 Suppl 1:26-30.
57. 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* 1990;103(6):1002-08.
58. Lacosta JL, Infante JC, Sánchez GL. Calcitonin and otosclerosis: a preliminary clinical note. *Acta Otorinolaringol Esp* 1997; 48(7): 561-564.
59. Lacosta JL, Sánchez HA, Gracia CJ. Possible benefits of calcitonin in the treatment of otosclerosis. *Acta Otorinolaringol Esp* 2003; 54(3): 169-172.
60. Arnold W, Kau R, Schwaiger M. Clinical aspects of the osteolytic (inflammatory) phase of cochlear otosclerosis. *Laryngorhinootologie* 1999;78(1):20-3.
61. Zerbini LF, Tamura RE, Correa RG, Czibere A, Cordeiro J, Bhasin M, et al. Combinatorial effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and NF-kappaB inhibitors in ovarian cancer therapy. *PLoS ONE* 2011; 6(9): e24285.
62. Guez D, Lesclous P, Baroukh B, Saffar JL. Impact of the timing of indomethacin treatment in a model of synchronized bone remodelling in rats. *Exp Physiol* 2001;86(3):373-9.
63. Niedermeyer HP, Zahneisen G, Luppá P, Busch R, Arnold W. Cortisol levels in the human perilymph after intravenous administration of prednisolone. *Audiol Neurootol* 2003;8(6):316-21.
64. Yilmaz I, Yilmazer C, Erkan AN, Aslan SG, Ozluoglu LN. Intratympanic dexamethasone injection effects on transient-evoked otoacoustic emission. *Am J Otolaryngol* 2005; 26(2):113-7.
65. Miyaji Y, Kurihara A, Kamiyama E, Shiiki T, Kawai K, Okazaki O. Pharmacokinetics and disposition of recombinant human osteoprotegerin (rhOPG) after intravenous administration in female fischer rats. *Xenobiotica* 2009;39(2):113-24.
66. Van Wijk F, Staecker H, Keithley E, Lefebvre PP. Local perfusion of the tumor necrosis factor  $\alpha$  blocker infliximab to the inner ear improves autoimmune neurosensory hearing loss. *Audiol Neurootol* 2006;11(6):357-65.
67. Lewiecki EM. Denosumab update. *Curr Opin Rheumatol* 2009;21(4):369-73.
68. Eisman JA, Bone HG, Hosking DJ, McClung MR, Reid IR, Rizzoli R, et al. Odanacatib in the treatment of postmenopausal women with low bone mineral density: three-year continued therapy and resolution of effect. *J Bone Miner Res*

- 2011;26(2):242-51.
69. Chole RA, McKenna M. Pathophysiology of otosclerosis. *Otol Neurotol* 2001; 22:249-257.
70. Karosi T, Sziklai I. Etiopathogenesis of otosclerosis. *Eur Arch Otolaryngol* 2010; 267(9): 1337-49.
71. 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* 2006; 116: 1478-84.
72. McKenna MJ, Kristiansen AG. Molecular biology of otosclerosis. *Adv Otorhinolaryngol* 2007; 65: 68-74.
73. Weegerink NJ, Schrauwen I, Huygen PL, Pennings RJ, Cremers CW, Van Camp G, Kunst HP. Phenotype of the first otosclerosis family linked to OTSC10. *Laryngoscope* 2011; 121(4): 838-45.
74. Csomor P, Liktor B, Liktor B, Sziklai I, Karosi T. No evidence for disturbed COL1A1 and A2 expression in otosclerosis. *European Archives of Otorhinolaryngology*, 2012; 269(9):2043-2051.
75. 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* 1998; 19:604-610.
76. 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* 2002; 111:184-189.
77. 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* 2004; 25:447-450.
78. Lehnerdt G, Unkel C, Metz KA, Jahnke K, Neumann A. Immunohistochemical evidence of BMP-2, -4 and -7 activity in otospongiosis. *Acta Otolaryngol* 2008; 128:13-17.
79. Harris SE, Bonewald LF, Harris MA, Sabatini M, Dallas S, Feng JQ, Ghosh-Choudhury N, Wozney J, Mundy GR. Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of

- fetal rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 855–63.
80. Zheng MH, Wood DJ, Wysocki S, Papadimitriou JM, Wang EA. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances expression of interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 genes in normal human osteoblast-like cells. *J Cell Physiol* 1994; 159: 76–82.
81. Csomor P, Sziklai I, Karosi T. Controversies in RELN/reelin expression is otosclerosis. *Eur Arch Otorhinlaryngol* 2012; 269(2): 431-40.
82. Schrauwen I, Ealy M, Huentelman MJ, et al. A genome-wide analysis identifies genetic variants in the RELN gene associated with otosclerosis. *Am J Hum Genet* 2009; 84 (3): 328–338.
83. Liktör B, Csomor P, Szász Cs, Sziklai I, Karosi T. No evidence for the expression of renin-angiotensin-aldosterone system in otosclerotic stapes footplates. *Otology Neurotology*, 2013; 34(5):808-15.
84. Niedermeyer HP Arnold W. Otosclerosis and measles virus – association or causation? *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2008; 70(1): 63-69.
85. Karosi T, Csomor P, Szekanecz Z, Sziklai I. Az otosclerosis etiopatogenezise. *Fül Orr Gégyógyászat* 2010; 56(4): 218-233.
86. Arnold W, Busch R, Arnold A, Ritscher B, Neiss A, Niedermeyer HP. The influence of measles vaccination on the incidence of otosclerosis in Germany. *Eur Arch Otorhinlaryngol* 2007 246(4): 741-48.
87. 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* 2008; 118: 1669-76.
88. Liktör B, Csomor P, Karosi T. Detection of otosclerosis-specific measles virus receptor (CD46) protein isoforms. *ISRN Otolaryngol* 2013; 6 p.
89. Horner KC. The effect of sex hormones on bone metabolism of the otic capsule – an overview. *Hear Res* 2009;252 (1-2): 56-60.
90. Csomor P, Sziklai I, Karosi T. TNF- $\alpha$  receptor expression correlates with histologic activity of otosclerosis. *Otol Neurotol* 2009;30(8): 1131-1137.
91. Schrauwen I, Thys M, Vanderstraeten K, Fransen E, Ealy M, Cremers CW, Dhooge I, Van de Heyning P, Offeciers E, Smith RJ, Van Camp G. No evidence for association between renin-angiotensin-aldosterone system and otosclerosis in a large Belgian-

- Dutch population. *Otol Neurotol* 2009; 30(8): 1079-1083.
92. Fano G, Venti-Donti G, Belia S, Pauludetti G, Antonica A, Donti E, Maurizi M. PTH induces modification of transductive events in otosclerotic bone cell cultures. *Cell Biochem Funct* 1993; 11: 257-61.
  93. Grayeli AB, Escoubet B, Bichara M, Julien N, Silve C, Friedlander G, Sterkers O, Ferary E. Increased activity of the diastrophic dysplasia sulfate transporter in otosclerosis and its inhibition by sodium fluoride. *Otol Neurotol* 2003; 24: 854-62.
  94. Yoo TJ. Etiopathogenesis of otosclerosis: a hypothesis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1984; 93(1): 28-33.
  95. Sommen M, Van Camp G, Liktör B, Csomor P, Fransen E, Sziklai I, Schrauwen I, Katrosi T. Genetic association analysis in clinically and histologically confirmed otosclerosis population confirms association with the TGF- $\beta$ 1 gene but suggests an association of RELN gene with a clinically indistinguishable otosclerosis-like phenotype. *Otol Neurotol* 2014; 35(6): 1058-64.
  96. Thys M, Schrauwen I, Vanderstraeten K, et al. The coding polymorphism T263I in TGF-beta1 is associated with otosclerosis in two independent population. *Hum Molecular Gen* 2007; 16: 2021-30.
  97. Chen W, Meyer NC, McKenna MJ, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the COL1A1 regulatory regions are associated with otosclerosis. *Clin Genet* 2007; 71:406-14.
  98. Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic power calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 2003; 19: 149-50.
  99. Gordon D, Finch SJ. Factors affecting statistical power in the detection of genetic association. *J Clin Invest* 2005; 115: 1408-18.
  100. Schrauwen I, Elay M, Fransen E, et al. Genetic variants in the RELN gene are associated with otosclerosis in multiple European population. *Hum Genet* 2010; 127: 155-62.
  101. Khalfallah A, Schrauwen I, Mnaja M, et al. Genetic variants in RELN are associated with otosclerosis in non-European population from Tunisia. *Ann Hum Genet* 2010; 74: 399-05.
  102. Van Dijk FS, Huizer M, Kariminejad A, Marcelis CL, Plomp AS, Terhal PA,

- Meijers-Heijboer H, Weiss MM, van Rijn RR, Cobben JM, Pals G. Complete COL1A1 allele deletions in osteogenesis imperfecta. *Genet Med* 2010; 12: 736-41.
103. Karsenty G, Park RW. Regulation of type I collagen genes expression. *Int Rev Immunol* 1995; 12: 177-85.
104. Thys M, Van Camp G. Genetics of otosclerosis. *Otol Neurotol* 2009; 30: 1021-32.
105. Nguyen Dinh Cat A, Touyz RM. A new look at the renin-angiotensin system focusing on the vascular system. *Peptides* 2011; 32(10): 2141-50.
106. Baudin B. New aspects on angiotensin-converting enzyme: from gene to disease. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40(3): 256-65.
107. Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, Carmeliet G, Kronenberg HM. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell* 2010; 19(2): 329-44.
108. Gelin L, Falkenham A, Oxner A, Sopol M, Légaré JF. Highly purified human peripheral blood monocytes produce IL-6 but not TNF- $\alpha$  in response to angiotensin II. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011; 12(3): 295-03.
109. Rudic M, Nguyen C, Nguyen Y, Milkvic L, Zarkovic N, Sterkers O, Ferrary E, Grayely B. Effect of angiotensin II on inflammation pathways in human primary bone cell cultures in otosclerosis. *Audiol Neurootol* 2012; 17(3): 169-78.
110. Imauchi Y, Jeunemaitre X, BouSSION M, Ferrary E, Sterkers O, Grayely AB. Relation between renin-angiotensin-aldosterone system and otosclerosis: a genetic association and in vitro study. *Otol Neurotol* 2008; 29(3): 295-01.
111. Frenz DA, Van de Walter TR, Galinovic-Schwartz V. Transforming growth factor beta: does it direct otic capsule formation? *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991; 100: 301-07.
112. Khalfallah A, Schrauwen I, Mnejja M, et al. Association of COL1A1 and TGF beta1 polymorphisms with otosclerosis in a Tunisian population. *Ann Hum Genet* 2011; 75: 598-04.
113. Rodriguez I, Rodriguez S, Hermida J, et al. 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* 2004; 128: 19-22.

114. McKenna MJ, Mills BG, Galey FR, Linthicum FH Jr. Filamentous structures morphologically similar to viral nucleocapsids in otosclerotic lesions in two patients. *Am J Otol* 1986; 7:25-28.

## 14. FÜGGELÉKEK



DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
PUBLIKÁCIÓK

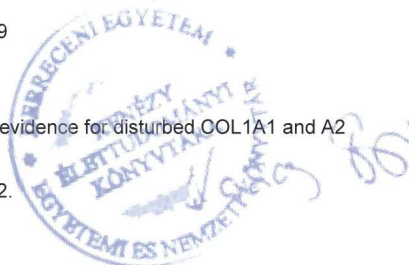


Iktatószám: DEENKÉTK/319/2014.  
Tételszám:  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Liktör Balázs  
Neptun kód: Y19JCN  
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Sommen, M., van Camp, G., **Liktör, B.**, Csomor, P., Franssen, E., Sziklai, I., Schrauwen, I., Karosi, T.: Genetic Association Analysis in a Clinically and Histologically Confirmed Otosclerosis Population Confirms Association With the *tgfb1* Gene but Suggests an Association of the *RELN* Gene With a Clinically Indistinguishable Otosclerosis-Like Phenotype. *Otol. Neurotol.* 35 (6), 1058-1064, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MAO.0000000000000334>  
IF:1.598 (2013)
2. **Liktör, B.**, Csomor, P., Szász, C.S., Sziklai, I., Karosi, T.: No Evidence for the Expression of Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Otosclerotic Stapes Footplates. *Otol. Neurotol.* 34 (5), 808-815, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MAO.0b013e31827d8a80>  
IF:1.598
3. 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.* 132 (6), 624-631, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/00016489.2011.653669>  
IF:1.106
4. 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.* 269 (9), 2043-2051, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-011-1859-5>  
IF:1.458



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518-600  
E-mail [publikaciok@lib.unideb.hu](mailto:publikaciok@lib.unideb.hu) □ Honlap: [lib.unideb.hu](http://lib.unideb.hu)



### További Közlemények

5. Takács I., **Liktor B.**, Förster G., Karosi T.: Ismeretlen eredetű, orbitába törő orrűregi tumor műtéti megoldása.  
*Fül-Orr-Gégegyógyászat. 60 (2), 49-51, 2014.*
6. **Liktor B.**, Csomor P., Szász C.S., Sziklai I., Karosi T.: Nincs bizonyíték a renin-angiotenzin-aldoszteronrendszer expressziójára otoszklerotikus stapestalpokban.  
*Fül-Orr-Gégegyógyászat. 60 (2), 36-41, 2014.*
7. **Liktor B.**, jr. Liktor, B., Kálmán, J., Horváth, B., Sziklai, I., Karosi, T.: Primary tuberculosis of the middle ear cleft: Diagnostic and therapeutic considerations.  
*Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryn. 271 (7), 2083-2089, 2014.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-014-2977-7>  
IF:1.608 (2013)
8. **Liktor B.**, Révész, P., Csomor, P., Gerlinger, I., Sziklai, I., Karosi, T.: Diagnostic value of cone-beam CT in histologically confirmed otosclerosis.  
*Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryn. 271 (8), 2131-2138, 2014.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-013-2702-y>  
IF:1.608 (2013)
9. **Liktor B.**, Csomor, P., Karosi, T.: Detection of Otosclerosis-Specific Measles Virus Receptor (Cd46) Protein Isoforms.  
*ISRN Otolaryngol. 2013, 6 p., 2013.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/479482>
10. Csomor P., **Liktor B.**, Liktor B., Sziklai I., Karosi T.: Nincs bizonyíték a COL1A1 és A2 allélek kóros expressziójára otosclerosisban.  
*Fül-Orr-Gégegyógy. 59 (1), 10-15, 2013.*
11. **Liktor B.**, Szekanez Z., Batta J.T., Sziklai I., Karosi T.: Az otosclerosis gyógyszeres kezelési lehetőségeinek áttekintése.  
*Fül-Orr-Gégegyógyászat. 59 (1), 2-9, 2013.*





12. Csomor P., **Liktor B.**, Liktor B., Szekanecz Z., Sziklai I., Karosi T.: A csontmorfogenetikus fehérjék (BMP 2, 4, 5, 7) expressziója összefüggést mutat az otosclerosis szövettani aktivitásával.  
*Fül-Orr-Gégegyógyászat.* 59 (3), 121-126, 2013.
13. **Liktor B.**, Szekanecz Z., Batta, J.T., Sziklai, I., Karosi, T.: Perspectives of pharmacological treatment in otosclerosis.  
*Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryn.* 270 (3), 793-804, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-012-2126-0>  
IF:1.608
14. Karosi T., **Liktor B.**, Csomor P., Szalmás A., Szekanecz Z., Sziklai I.: Az otosclerosisra jellemző kanyaróvírusreceptor (cd46) variánsok fehérjeszintű kimutatása: Az otosclerosis genetikai modellje.  
*Fül-Orr-Gégegyógyászat.* 58 (2), 53-59, 2012.
15. Csomor P., **Liktor B.**, Sziklai I., Karosi T.: A reelin expresszió szerepe az otosclerosis patogenezisében.  
*Fül-Orr-Gégegyógyászat.* 58 (3), 101-106, 2012.

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 10,584**

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 5,76**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.10.01.

