

Otosclerosis: a sejt-túlélés és az apoptózis szabályozásának zavara

Csomor Péter dr.; Karosi Tamás dr., Liktör Bálint dr.¹; Z. Szabó László dr.¹, Pytel József dr.², Jóri József dr.³, Sziklai István dr.

ÖSSZEFOGLALÁS: Az otosclerosis az emberi oticus capsula gyulladásos csontátépülési zavara, amelyet a sejtsztómás- és az apoptózis-, tumor nekrosis faktor-alfa által létrehozott szabályozási zavara jellemezhet. Az otosclerosis kórszövettani jellegzetességeit az elmúlt évtizedekben részletesen tanulmányozták és leírták, azonban a különböző kórszövettani- és klinikai stádiumokban észlelhető osteoclast-osteoblast anyagcserezavar molekuláris biológiai jellemzése még nem fejeződött be. Negyven stapedectomy során eltávolított, ankyloticus stapes talp (N=40, férfiak=17, nők=23) kórszövettani vizsgálatát végeztük el: hagyományos hematoxylin-eozin festést és hCIAP1/2- (apoptózis inhibitor) valamint granzyme-b (apoptózis induktor) specifikus immunofluoreszcens vizsgálatot végeztünk. Negatív kontrollként négy darab egészséges stapes talpat alkalmaztunk, melyeket eseménytelen fülészeti anamnézissel rendelkező cadaverekől távolítottunk el. Az aktív otosclerost (N=19) a hCIAP1/2 apoptózis inhibitor fehérjék rendkívül erős immunreakciója jellemezte, ezzel szemben a granzyme-b specifikus immunreakció elhanyagolható jelölődést mutatott. Az inaktív otosclerosis (N=8) esetén lényegében fordított immunreakciót tapasztaltunk, hiszen a granzyme-b erőteljes expressziója mellett a hCIAP1/2 specifikus immunreakció hiányzott. A nem-otosclerosis stapes fixációk (N=13) és a negatív kontrollként használt stapes talpak (N=4) nem adtak értékelhető granzyme-b specifikus reakciót, azonban a hCIAP1/2 komplex expressziója finomszemcsés cytoplasmaticus festődés formájában megfigyelhető volt. Az apoptózist gátló és serkentő fehérjék kifejeződési szintje és mintázata statisztikailag is erőteljes összefüggést mutatott a stapes ankylosis szövettani diagnózisával és ezen belül az otosclerosis kórszövettani aktivitásával (χ^2 -próba, $p < 0,05$). Az otosclerosis aktív és inaktív stádiumaiban ellentétesen és szokatlan mértékben kifejeződő apoptózis inhibitor (hCIAP1/2) és induktor (granzyme-b) fehérjék a sejt-túlélés és az apoptózis szabályozási zavarára utalnak.

KULCSSZAVAK: apoptózis, granzyme-b, hCIAP1/2, nem-otosclerosis stapes fixáció, otosclerosis, sejt-túlélés

SUMMARY: Otosclerosis is an inflammatory bone remodeling disorder of the human otic capsule, which might be characterized by disturbed balance of cellular survival and apoptosis due to increased expression of inflammatory cytokines, mainly tumor necrosis factor-alpha. Histological characteristics of otosclerosis have been well described during the latest decades; however, the grading of different histopathological and clinical stages has not been attributed precisely to the molecular biology of the pathologically increased metabolism of osteoclast-osteoblast axis. Forty ankylotic stapes footplates (N=40, males=17, females=23) removed by stapedectomy were histologically analyzed: conventional hematoxylin-eosin staining and hCIAP1/2 (inhibitors of apoptosis) and granzyme-b (apoptosis inducer) specific immunofluorescent assays were performed. Four normal stapes footplates obtained from cadavers with negative otological history were employed as negative controls. Active otosclerosis (N=19) was featured by robust expression of apoptosis inhibitor proteins hCIAP1/2 and negligible expression of granzyme-b. Inactive cases of otosclerosis (N=8) were characterized by inverse reaction: granzyme-b was highly expressed; however, hCIAP1/2 specific immunoreactions were absent. Non-otosclerotic (N=13) and normal stapes specimens (N=4) showed no considerable granzyme-b expression and moderate hCIAP1/2 specific immunoreactions. The expression pattern and level of apoptosis inhibitors and inducers showed strong correlation with the histological diagnosis and activity of otosclerosis (χ^2 test, $p < 0.001$). Detection of the inversely expressed apoptosis inhibitor (hCIAP1/2) and inducer (granzyme-b) proteins in active and inactive stages of otosclerosis demonstrates pathological regulation of cell survival and apoptosis. These results might provide the molecular basis of otosclerotic bone remodeling disorder.

KEYWORDS: apoptosis, cell survival, granzyme-b, hCIAP1/2, non-otosclerotic stapes fixation, otosclerosis

Bevezetés

Az otosclerosis az emberi oticus capsula gyulladásos csontátépülési zavara, amely a stapes talp rögzülése és a belfül csontos tokjában megjelenő osteolyticus góccok révén progresszív vezetési és/vagy

szenzorineurális halláscsökkenést okoz (1). Az otosclerosis góccok kizárólag az oticus capsulában illetve az ennek részeként felfogható stapes talpban jelennek meg (1, 2). Az otosclerosis kórszövettani jellegzetességeit és stádiumait az elmúlt évtizedekben részletesen leírták; mégis felmerül a kérdés, hogy az ak-

tív, illetve az inaktív otosclerosis egyazon csontremodellizációs zavar (otosclerosis-otospongiosis) egymással összekapcsolható stádiumai-e, vagy különböző folyamatok egymástól független manifesztációi?

Korábbi tanulmányok eredményei szerint az aktív otosclerosisos góciókban nagymennyiségű tumor nekrozis faktor-alfa (TNF-alfa) szabadulhat fel (2–5). A TNF-alfa molekulaméreténél fogva (<50 kDa) könnyen bediffundál a perilympa (Corti-lympa) térbe, ahol megváltoztatva a külső szőrsejtek elektromotilitását, végső soron szenzorneurális halláscsökkenést eredményez (5–7). A stapes talp otosclerosisos átépülése esetén a vestibularis felszín hyalinporc rétege sérül, majd eltűnik, helyén lacunák és microporusok alakulnak ki, melyek a TNF-alfa kiáramlás csatornáiként szolgálhatnak. A fenti elképzelést Répássy és mtsai elegáns elektronmikroszkópos vizsgálataik során szintén megerősítették az otosclerosisos stapes talpakban (8).

A TNF-alfa két receptorral rendelkezik (9–11). Az I-es típusú TNF-alfa receptor (TNFRI, *member of TNF superfamily I*) a biológiai hatások lényegesen szélesebb spektrumával rendelkezik, mint a II-es típusú TNF-alfa receptor (TNFRII, *member of TNF superfamily-II*) (10, 11). Az I-es és II-es TNF-alfa receptorokkal összefüggésbe hozható jelátviteli folyamatok közül legfontosabbnak az úgynevezett „death domain” mediált és kaszpáz-függő apoptózis indukció tűnik (11–13). A TNF-alfa receptorok TRADD (*TNF receptor associated death*) doménjei hozzákötődnek a FADD (*fas-associating death domain containing protein*) fehérjékhez, melyek a CPC-8 (*cysteine protein caspase-8*) kaszpáz komplexek kialakulását mediálják (13). A kaszpáz-8 jelű fehérjék a legerősebb apoptózis effektorok közé tartozva, igen gyors pramozott sejthalált okoznak (11, 13).

Az apoptózis a sejthalál egy speciális formája, amely a nekrozistól funkcionálisan és morfológiailag is különbözik (9, 10, 14). Általánosságban, az apoptózist a nuclearis chromatin kondenzációja, a cytoplasma zsugorodása, az endoplasmaticus reticulum tágulata és a sejtmembrán hólyagszerű zárványai jellemzik (13). Az apoptózis kétféle útvonalon mehet végbe: 1. a Bcl-2 által gátolható vagy másnéven *intrinsic úton*, melyet intracelluláris károsodások, celluláris stressz, fejlődési rendellenességek és toxikus té-

nyezők indítanak el; és 2. a kaszpáz-8/10 függő- vagy *extrinsic úton*, melyet a „death receptorok” ligandkötése indukál (9, 10, 13, 14). A „death receptorok” aktiválódása a TNF-szupercsalád ligandjainak (pl. TNF-alfa) receptorkötődése révén következik be (15). A TNF-szupercsaládhoz tartozó ligandok felszabadulása az immunrendszer konkrét cytotoxicus válaszaihoz köthető, melyek bizonyos vírusfertőzések-, illetve a CD8 pozitív T-lymphocyták (CTL, *cytotoxic T-lymphocyte*) és a természetes ölősejtek (NK, *natural killer cells*) érése és aktiválódása során alakulnak ki (10, 13, 15).

Eddigi megfigyeléseink alapján azt feltételeztük, hogy az otosclerosisban tapasztalható gyulladásos csontátépülési zavart az apoptózist gátló (hCIAP1/2) és serkentő (granzyme-b) fehérjék fiziológiás egyensúlyának TNF-alfa által okozott felborulása okozhatja. Az 1-es típusú (hCIAP1, *baculoviral inhibitor of apoptosis repeat 2*) és a 2-es típusú (hCIAP2, *baculoviral inhibitor of apoptosis repeat 3*) apoptózis inhibitorok olyan fehérjék szupercsaládjába tartoznak, amelyek a TNF-alfa receptor asszociált faktorok (TRAF1, TRAF2) megkötése és az ICE-szerű (*interleukin-1 converting enzyme*) proteázok degradálása révén gátolják az apoptózist (14, 16, 17). A hCIAP1 a menadion által indukált apoptózist is gátolja (18, 19, 20). Ennek említése azért is fontos, mert a menadion (és még számos toxicus szer, pl. ciszplatin) hatására szabadgyökök keletkeznek, melyek központi szerepet töltenek be bizonyos szenzorneurális halláscsökkenések pathogenezisében.

A granzyme-b-t (*granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1*) CD8 pozitív cytotoxic T-sejtek és NK-sejtek termelik (13, 19). Jelenleg azt feltételezik, hogy a fenti sejtek azáltal védik meg a szervezet egészséges sejtjeit, hogy a különböző, nem-saját felszíni antigéneket kifejező, általában intracelluláris pathogénekkal fertőzött sejtekben apoptózist indukálnak (9, 10, 14). A granzyme-b központi szerepet tölt be a célsejtek gyors apoptózis indukciójában (10, 14).

Tanulmányunkban otosclerosisos és nem-otosclerosisos stapes talpak hCIAP1/2 és granzyme-b expressziós mintázatát vizsgáltuk az otosclerosis kórszövettani aktivitásával összevetve, azzal a céllal, hogy felfedhessük az otosclerosis egyes stádiumai között észlelhető átmenet molekuláris biológiai hátterét.

Anyagok és módszerek

Betegek és kontroll minták

Tanulmányunkban negyvennégy stapes talp (N=44, férfiak=20, nők=24) kórszövettani és im-

Közlésre érkezett: 2009.11.26.

DE OEC, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika

Cím: 4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.

Tel./Fax.: + (36-52) 414-763

e-mail: karositamas@gmail.com

web: www.earpathology.eu

munfluoreszcens vizsgálatát végeztük el. A fenti minták közül negyven ankyloticus volt (N=40, férfiak=17, nők=23), ezeket stapedectomy során távolították el. Az eltávolított stapes mintákat azonnal pufferelt formalin oldatba helyeztük. A betegek átlagéletkora 42,19 év volt (tartomány: 21–67 év). A tanulmányban felhasznált mintákat előzetes szövettani vizsgálatok alapján (H.E. festés) válogattuk ki egy nagyobb, ankyloticus stapes mintákból álló anyagból (N=217), annak érdekében, hogy kisebb és reprezentatív otosclerosisos- valamint nem-otosclerosisos stapes mintákból álló vizsgálati csoportokat nyerjünk. A stapes fixáció klinikai diagnózisát az otoscopy-, az audiológiai- és a tympanometriás leletekre alapoztuk. Az 1000 Hz-es frekvencián mért csont-lég köz legalább 30 dB volt. A preoperatív tympanometria során az esetek 27%-ában A-típusú, míg 73%-ában As-típusú tympanogramot kaptunk. A stapes fixáció a betegek kétharmadában klinikailag kétoldali volt, azonban minden beteg esetén csak egy stapes mintát elemeztünk, mivel a rövid vizsgálati időszakban az esetek nagy többségében csak egy oldali stapedectomy történt. Negatív kontrollként négy eseménytelen fülészeti anamnézissel rendelkező cadaverből származó jobb oldali stapes talpat alkalmaztunk (az eltávolítás az exitust követő 24 órán belül történt, férfiak=3, nők=1). A negatív kontrollok átlagéletkora 53,2 év volt (tartomány: 48–63 év). A stapes mintákat 2009. február és 2009. november kö-

zött gyűjtöttük (PTE, ÁOK, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika; SZTE, ÁOK, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika; Bajcsy-Zsilinszky Kórház, Fül-Orr-Gége Osztály). A tanulmányt az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos Kutatásértékelési Bizottsága az ETT-TUKB/200811354789 nyilvántartási számon engedélyezte.

Szövettani és hCIAP1/2- valamint granzyme-b specifikus immunfluoreszcens vizsgálat

A negyvennégy stapes mintát 10%-os (m/v) pufferelt formalin-oldatban fixáltuk, majd 0,5 M-os Na-EDTA oldatban (nátrium etilén-diamino-tetraacetát, 72 óra, 4 °C) dekalcináltuk. A mintákat 15%-os, analitikai tisztaságú zselatinba ágyaztuk (24 óra, 56 °C), majd 4%-os (m/v) paraformaldehid oldatban újrafixáltuk (24 óra, 20 °C). A megszilárdult zselatinból kiképzett szövettani blokkokat krioprotekció céljából 20%-os (m/v) szacharóz oldatba helyeztük (2 óra, 4 °C), majd 10 µm vastagságú metszetekre szeleteltük (–40 °C) (MNT cryomicrotome, Slee, Németország). A metszeteket 0,1 M-os, 0,02% (m/v) nátrium azidot is tartalmazó PBS-ben (phosphate-buffered saline) tároltuk 4 °C-on. A 10 µm vastagságú metszetsorozatokból két párhuzamos vizsgálatot végeztünk: 1. hagyományos hematoxylin-eozin (H.E.) festés; és 2. hCIAP1/2 valamint granzyme-b specifikus immunfluoreszcens vizsgálat. A hema-

1. táblázat

A hCIAP–1/2 és a granzyme-b apoptózis markerek expressziója különböző okokból fixált és normális stapes talpakban

Szövettani lelet (N=44)	¹ hCIAP-1	² hCIAP-2	³ granzyme-b
Otosclerosis (N=27)			
Aktív- (N=19)	++++	++++	–/+
Inaktív- (N=8)	–	–/+	++++
Hyalinporc réteg	++	+++	–/+
Nem-otosclerosisos stapes fixáció (N=13)			
Annularis calcificatio (N=11)	+	+	–
Haemosiderosis (N=2)	+	+	–
Hyalinporc réteg	++	+++	–
Normális stapes talpak (N=4)	++	++	–
Hyalinporc réteg	++	+++	–

¹hCIAP-1 – hivatalos (PubMed Génbank) név: baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis) repeat-containing 2;

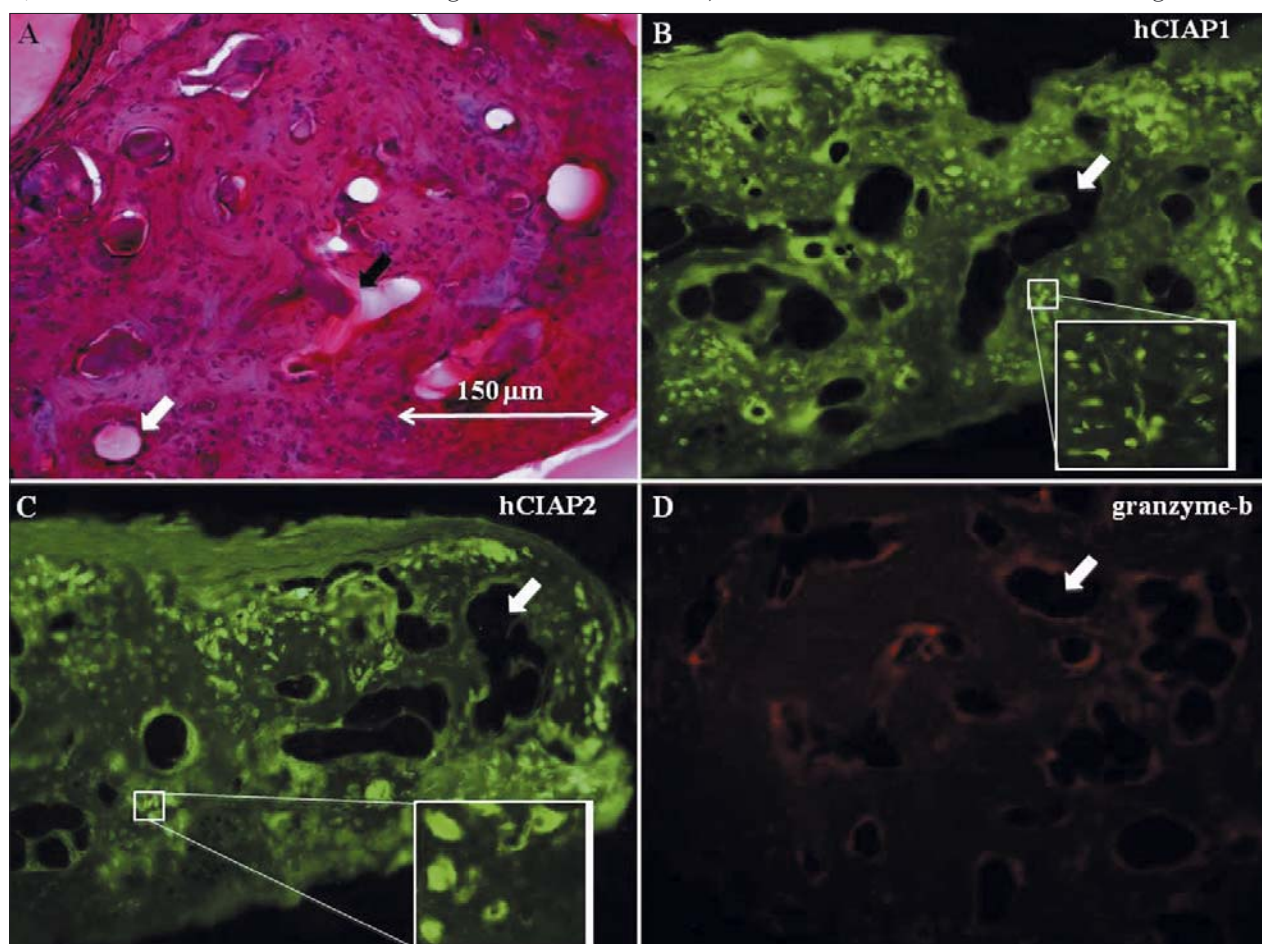
²hCIAP-2 – hivatalos (PubMed Génbank) név: baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis) repeat-containing 3;

³granzyme-b – hivatalos (PubMed Génbank) név: cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1.

Az immunfluoreszcens reakciók intenzitása és mintázata: +: gyenge annuláris immunreakció; ++ gyenge homogén immunreakció; +++ erős homogén vagy gyenge granuláris immunreakció; ++++ erős összefolyó és erőteljes granuláris reakció; –: negatív reakció

toxylin-eozin festés részleteit korábbi tanulmányaikban már bemutattuk. A metszetek másik részét 0,2 M-os, Protein BlockTM oldatot is tartalmazó PBS-ben mostuk (20 perc, 20 °C) (1% [m/v], bovine serum albumin [BSA], 0,09% [m/v], nátrium azid, 0,1% [m/v], Tween-20) (BioGenex, CA, Egyesült Államok). A blokkolt metszeteket 0,005 mg/ml koncentrációjú poliklonális kecske anti-humán hCIAP1 antitest oldattal inkubáltuk (100 µl, 0,02% [m/v] nátrium azid, 20 °C, 24 óra, folyamatos rázás) (R&D Systems, Egyesült Államok). Az első elsődleges antitestet 0,2 M-os PBS oldattal kimostuk. Ezt követően a metszeteket 0,005 mg/ml koncentrációjú poliklonális számar anti-humán hCIAP2 antitest oldattal inkubáltuk (100 µl, 0,02% [m/v] nátrium azid, 20 °C, 24 óra, folyamatos rázás) (R&D Systems, Egyesült Államok). A második elsődleges antitestet szintén 0,2 M-os PBS oldattal mostuk ki. Végül a harmadik

primer antitesttel történő inkubálás következett: 0,02 mg/ml koncentrációjú monoklonális egér hybridoma anti-humán granzyme-b specifikus antitest oldat (100 µl, 0,02% [m/v] nátrium-azid, 20 °C, 24 óra, folyamatos rázás) (R&D Systems, Egyesült Államok). A harmadik elsődleges antitestet szintén 0,2 M-os PBS oldattal mostuk ki. A mosási lépéseket követően a metszeteket 0,005 mg/ml koncentrációjú, Northern LightsTM márkájú, számar anti-kecske IgG oldattal inkubáltuk, mely NL-493 fluorokrómot tartalmazott (50 µl, 20 °C, 12 óra, folyamatos rázás) (R&D Systems, Egyesült Államok). Az első másodlagos antitestet 0,2 M-os PBS-ben mostuk. Ezután a második sekunder antitest hozzáadása következett: 0,005 mg/ml Northern LightsTM kecske anti-számar IgG NL-557 fluorokrómmal jelölve (50 µl, 20 °C, 12 óra, folyamatos rázás) (R&D Systems, Egyesült Államok). Mosást követően a metszeteket végül a har-

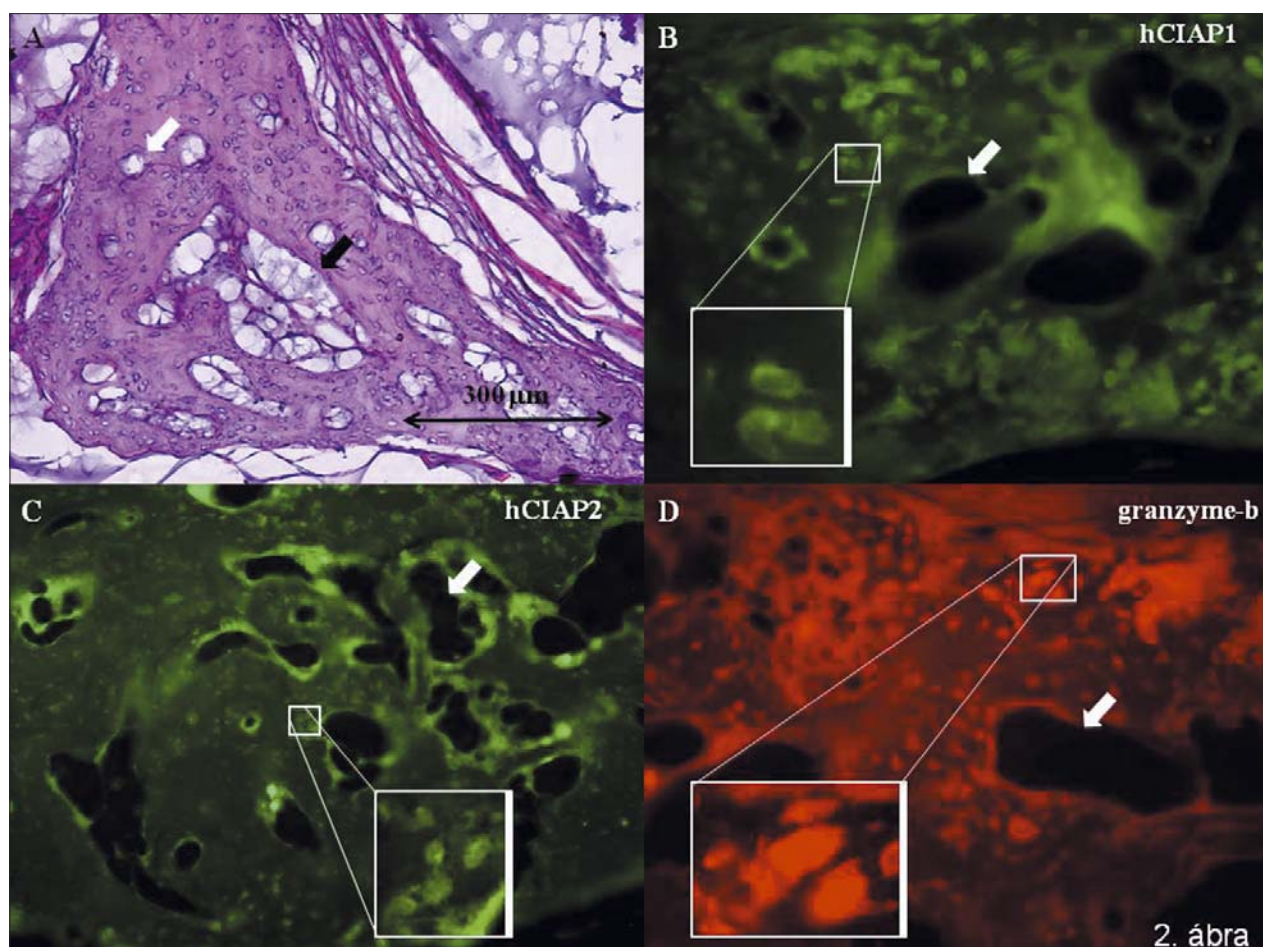


1. ábra. A hCIAP1/2 és a granzyme-b expresszió immunfluoreszcens vizsgálata aktív otosclerosis esetén.
A: Aktív otosclerosisos góc a stapes talp hátsó pólusában (H.E.). Hypercellularitas és tágult pseudovascularis terek (fekete nyíl) észlelhetők. A fehér nyíl egy tágult érre mutat.
B: A hCIAP1 expresszió kimutatása az előző metszetben. Az osteoclastok élénk, granularis és perinuclearis hCIAP1 specifikus immunreakciót adnak. A kis képinzert nagyobb nagyítással mutatja be a hCIAP1 kifejeződést adó osteoclastokat.
C: Az otosclerosisos góc sejtjei intenzív homogén, cytoplasmaticus hCIAP2 specifikus immunreakciót mutatnak. A kis képinzert nagyobb nagyítással mutatja be a hCIAP2 kifejeződést adó osteoclastokat.
D: A granzyme-b specifikus immunreakció gyakorlatilag negatív. A fehér nyilak az otosclerosisos gócok tágult pseudovascularis tereit mutatják.

madik másodlagos antitesttel inkubáltuk: 0,005 mg/ml koncentrációjú, Northern Lights™ márkájú, számár anti-egér IgG, mely NL-637 fluorokrómot tartalmazott (50 µl, 20 °C, 12 óra, folyamatos rázás) (R&D Systems, Egyesült Államok). Minden antitest inkubációs lépést steril nedves kamrában végeztünk el. A tárgylemezre felszedett metszeteket UV-fény át-eresztő fedőanyaggal fedtük le (PromoFluor Antifade Reagent, Promocell, Németország). A szövettani metszetek fényképezését UV-fény alatt, átlagosan 96–123 ms expozíciós idővel végeztük el. Az NL-493 jelű flouorokrómnál 510-, az NL557-jelűnél 574-, míg az NL637-jelűnél 650 nm-es gerjesztési hullámhosszat alkalmaztunk. A digitális fényképeket jpeg fájlformátumban archiváltuk (Axioskop2 MOT, Axiovision 4.0, Zeiss, Németország).

Eredmények

A tanulmányban szereplő stapes talpából két párhuzamosan elemzett metszetsorozatot készítettünk, melyeket hagyományos hematoxylin-eozin festésnek és hCIAP1/2 valamint granzyme-b specifikus immunfluoreszcens vizsgálatnak vetettünk alá. A részlegesen eltávolított és utólag nem rekonstruálható stapes talpakat kizártuk a tanulmányból, hiszen az ovális ablakban maradt elülső- illetve hátsó stapes talp részletek tartalmazhatták a valódi csontos fixációt okozó elváltozást. Azok a fragmentált minták, amelyeket a szövettani orientáció és a beágyazás során sikeresen rekonstruáltunk, a tanulmányban maradtak. Kórszövettani vizsgálattal alátámasztott otosclerosist 27 ankyloticus stapes talpban diagnosztizáltunk.



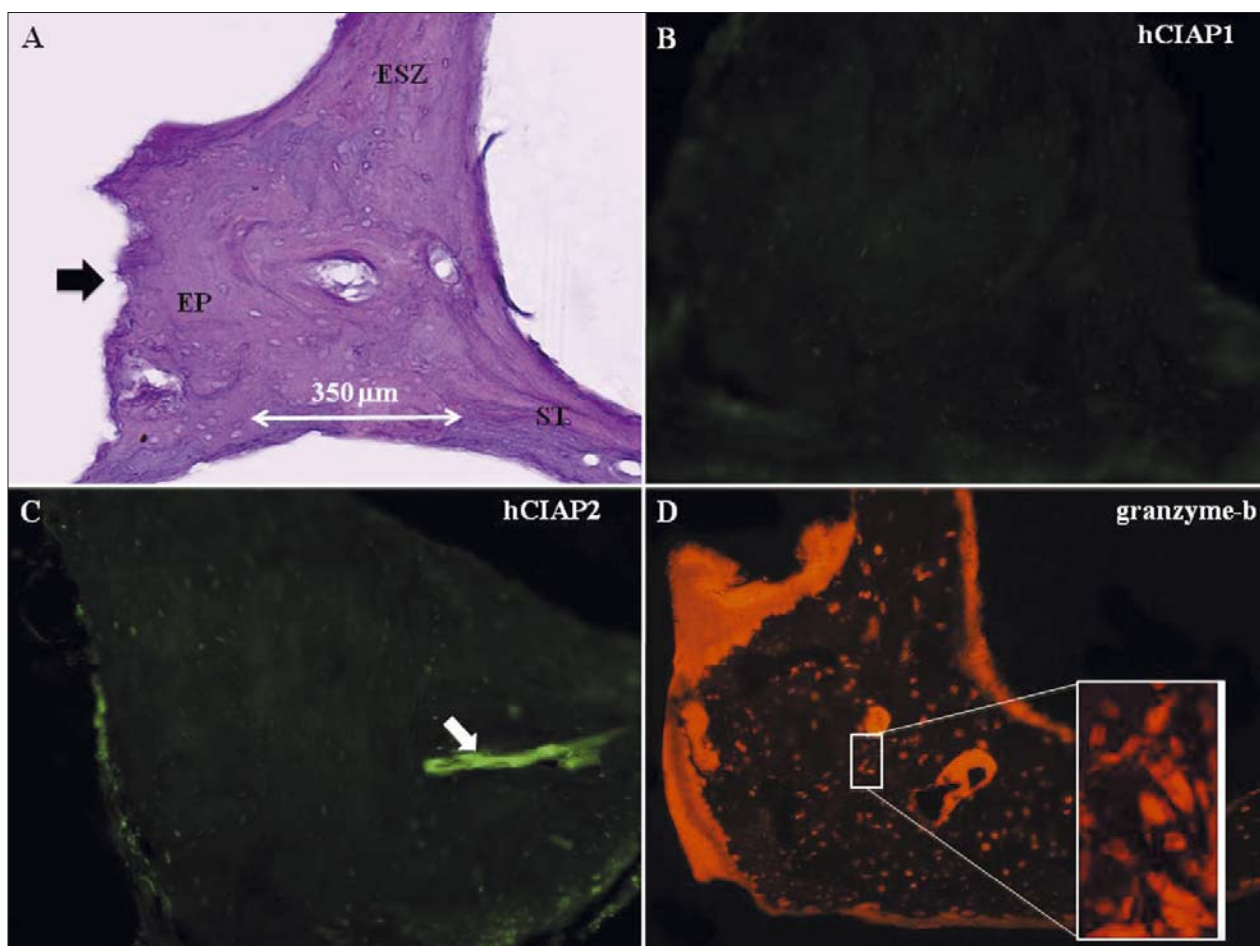
2. ábra

2. ábra. A hCIAP1/2 és a granzyme-b expresszió immunfluoreszcens vizsgálata csökkent aktivitású otosclerosis esetén. A: Mérsékelt aktivitású otosclerosisos góc a stapes talp elülső pólusában (H.E.). A pseudoseptumokkal elválasztott pseudovascularis tereket fekete nyíl mutatja. A fehér nyíl egy tágult eret mutat. Az osteoid alapállomány még hypercellularis, a cementvonalak azonban szabálytalan fonatos és koncentrikus mintázatot mutatnak. Az otosclerosisos góc osteoclastjai üres hypochromaticus magokkal bíró sejt haloként jelennek meg.

B: A hCIAP1 expresszió kimutatása az előző metszetben. Az otosclerosisos léziót alkotó osteoclastok, közepesen erős, annularis immunreakciót mutatnak. A kis képinzert nagyobb nagyítással mutatja be a hCIAP1 kifejeződést adó osteoclastokat.

C: A hCIAP2 specifikus immunreakció gyenge granularis cytoplasmaticus festődést mutat. A kis képinzert nagyobb nagyítással mutatja be a hCIAP2 kifejeződést adó osteoclastokat.

D: A granzyme-b expresszió intenzív homogén cytoplasmaticus mintázatot követ. A kis képinzert nagyobb nagyítással mutatja be a granzyme-b kifejeződést adó osteoclastokat.



3. ábra. A hCIAP1/2 és a granzyme-b expresszió immunfluoreszcens vizsgálata inaktív otosclerosis esetén.

A: Inaktív otosclerosisos góc a stapes talp elülső pólusában. Hypocellularitas, hypovascularisatio, jelzett basophilias és a cementvonalak fonatos szerkezete figyelhető meg (H.E.). A hyalinporc réteg deformált (fekete nyíl). EP: elülső pólus, ESZ: elülső szár, ST: stapes talp.

B: A hCIAP1 specifikus immunreakció gyenge annularis festődési mintázatot mutat.

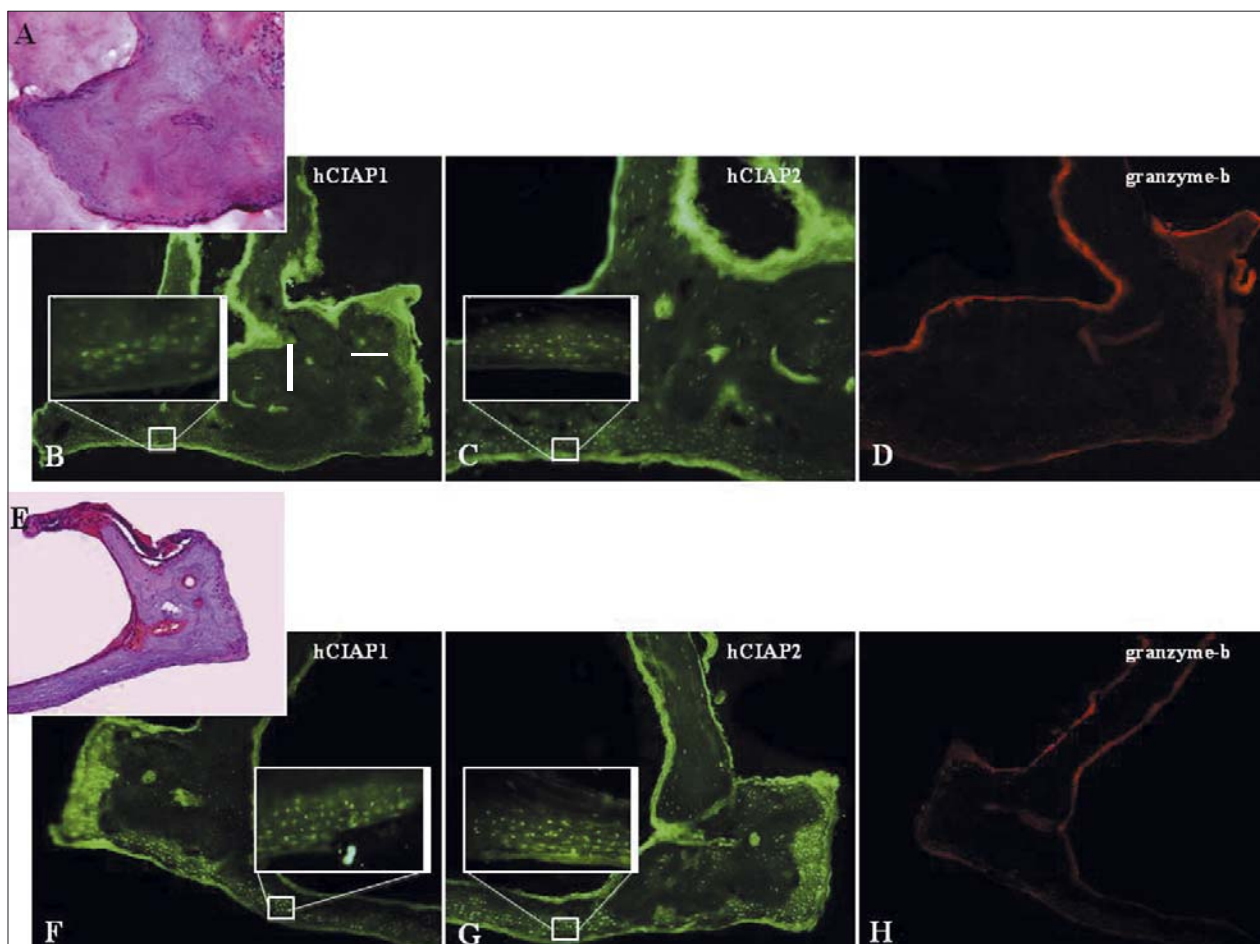
C: A laesiót alkotó sejtek hCIAP2 expressziója elhanyagolható mértékű. A fehér nyíl egy eret jelöl, melynek endotheliuma jelentős hCIAP2 expressziót mutat.

D: Szemben az apoptózis inhibitorokkal, a granzyme-b specifikus immunreakció rendkívül élénk, homogén cytoplasmaticus festődést ad. A kis képinzert nagyobb nagyítással mutatja be a granzyme-b kifejeződést adó sejteket.

tizáltunk. Ezen betegek között az otosclerosisos góc 19 esetben volt aktív és 8 esetben inaktív (1. táblázat, 1. ábra, 2. ábra, 3. ábra). Az aktív otosclerosist vaskos, deformált stapes talp jellemezte, amelyben a cementvonalak szabálytalan, fonatos elrendeződést mutattak. Ebben az esetben az otosclerosisos góc jellegzetesen basophil festődést mutatott; a hypervascularisalt, fibrosus stromában számos többmagvú osteoclast és szabálytalan osteoblast volt felfedezhető. Az otosclerosisos gócok összességében „svájci sajtra” emlékeztető szerkezetet mutattak, amely a tágas és kötőszövetes septumokkal tagolt pseudovascularis tereknek köszönhető. Ezen terek valójában a Howship-típusú osteolyticus lacunáknak felelnek meg (1. ábra, 2. ábra). Az inaktív otosclerosist szövettanilag elsősorban eosinophil festődés, valamint a cementvonalak fonatos és helyenként lamellaris elrendeződése

jellemezte. Az osteoclastok és az osteoclastok hiányoztak, helyüket „halo” sejtek foglalták el. A pseudovascularis terek közel teljes obliterációt mutattak. A teljesen átépült csontállományt hypocellularitas, avascularisatio és intenzív eosinophil festődés jellemezte (3. ábra). A tizenhárom nem-otosclerosisos stapes talpban annularis calcificációt (eosinophil extracelluláris mátrix, csökkent cellularitas és hypovascularisatio; N=11) és haemosiderosist (teljes átépülés a stapes talpban számos haemosiderophaggal; N=2) találtunk (1. táblázat, 4. ábra).

A stapes talpak vestibularis felszínének hyalinporc rétegében elhelyezkedő chondrocyták minden esetben erős hCIAP1/2 specifikus festődést mutattak (1. táblázat, 4. ábra). A granzyme-b specifikus immunreakció ezzel szemben negatív volt (1. táblázat, 4. ábra). Ez az eredmény nem volt meglepő, hiszen ezek a sej-



4. ábra: A hCIAP1/2 és a granzyme-b expresszió immunfluoreszcens vizsgálata nem-otosclerosisos stapes fixációk és egészséges stapes talpak esetén.

A: annularis calcificatio (H.E.). A stapes talp deformált, acellularis, a cementvonalak lamellaris mintázatot követnek. A hyalin réteg feltöredezett (fekete nyíl).

B: Az előző metszetben gyenge annularis hCIAP1 expresszió észlelhető.

C: A hCIAP2 szintén gyenge annularis kifejeződési mintázatot mutat.

D: A granzyme-b specifikus immunreakció negatív.

E: Normális stapes talp (H.E.).

F: Az előző metszetben gyenge annularis hCIAP1 expresszió észlelhető.

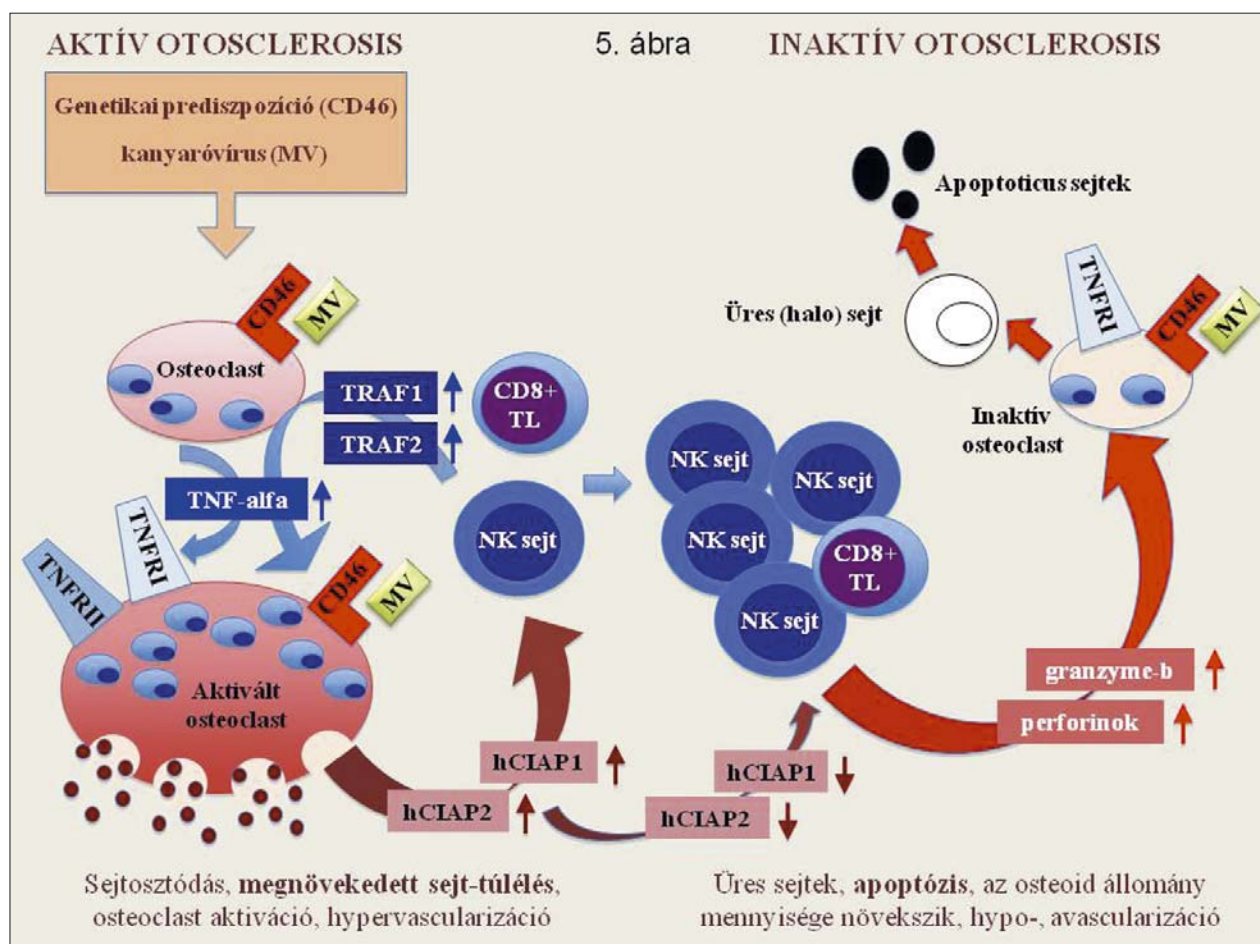
G: A hCIAP2 szintén gyenge annularis kifejeződési mintázatot mutat.

H: A granzyme-b expressziója nem mutatható ki. A beillesztett kisebb képek a stapes talp vestibularis felszínén lévő hyalinporc réteg hCIAP1 és hCIAP2 specifikus immunreakcióját mutatják. A szövettani diagnózistól függetlenül, a chondrocyták erős, annularis reakciót adnak az apoptózis inhibitor fehérjékkel szemben

tek az egész élet során perzisztáló embryonalis maradványként foghatók fel, amelyek a programozott sejthalál jeleit nem mutatják. Ezek a nyugvó, immortalizált chondrocyták lehetnek a stapediale otosclerosis kiindulási sejtípusai.

Az apoptózis inhibitor (hCIAP1/2) és induktor (granzyme-b) fehérjék expressziós szintjei és mintázata statisztikailag szignifikáns összefüggést mutatott az otosclerosis szövettani aktivitásával (X2-próba, $p < 0,05$) (1. táblázat). Az aktív otosclerosist a tágas pseudovascularis ürökben elhelyezkedő, számos többmagvú osteoclast típusú óriássejt jellemezte, amelyek igen élénk, granularis hCIAP1 és hCIAP2 antigén expressziót mutattak (1. ábra). A hCIAP2

fehérjével szemben, amely homogén cytoplasmaticus expressziót mutatott, a hCIAP1 kifejeződését granularis perinuclearis mintázat jellemezte (1. ábra, 2. ábra). Aktív otosclerosis esetén a granzyme-b immunreakció negatív volt, amely erőteljesen gátolt apoptózisa és a hagyományos metszeteken is megfigyelhető élénk sejtproliferációra utal (1. ábra). Ebben az esetben a sejt-túlélés is megnövekedett az élettanihoz képest, de ez a pillanatképként értelmezhető H.E. festett metszeteken nem interpretálható. Az aktív otosclerosis szemben az előrehaladott, inaktív otosclerosis kisszámú, gyenge linearis vagy negatív hCIAP1 és hCIAP2 expressziót mutató osteoclast jellemezte (3. ábra). A H.E. festett metszeteken az



5. ábra: Az otosclerosis egyes kórszövettani stádiumai közötti átmenetet ábrázoló sematikus diagramm. Az aktív otosclerosist az NK- és a CD8 pozitív T-sejtek által termelt TNF-alfa és TRAF felszabadulás jellemzi, amely osteoclast aktivációt, fokozott sejt-túlélést és hypervascularizációt eredményez. Az aktivált osteoclastok még több TNF-alfát termelnek, mellyel az osteoclast precursorok toborzását érik el. Negatív feed-back folyamatként fokozódik az apoptózis inhibitor fehérjék expressziója, mely a TNF-alfa által indukált apoptózist gátolva, majd lassítva a sejtek túlélését biztosítja.

Az inaktív otosclerosist nagy mennyiségű avascularisált osteoid alapállomány jellemzi, melyből az osteoclastok már hiányoznak. Az aktivált immunsejtek további akkumulációja intenzív granzyme-b és perforin felszabadulással jár, amely a célsejtek apoptózisához és az otosclerosis folyamat kiégéséhez vezet.

Rövidítések az ábrában:
 CD8+ TL: CD8 pozitív T-lymphocyta, CD46: kanyaróvírus receptor, hCIAP1: apoptózis inhibitor, hCIAP2: apoptózis inhibitor, MV: kanyaróvírus, NK-sejt: natural killer sejt, TNF-alfa: tumor nekrosis faktor-alfa, TNFRI: I-es típusú TNF-alfa receptor, TNFRII: II-es típusú TNF-alfa receptor, TRAF1: TNF-alfa receptor asszociált faktor 1, TRAF2: TNF-alfa receptor asszociált faktor 2.

inaktív otosclerosist üres, chromatin-mentes sejttárgyakok jellemezték, amelyek rendkívül erőteljes granzyme-b specifikus immunreakciót adtak (2. ábra, 3. ábra). Ez a megfigyelés a programozott sejthalál aktív folyamatára utal.

Szemben az otosclerosis stapes talpakkal, a nem-otosclerosis stapes fixációk esetén és az egészséges stapes talpakban a granzyme-b expresszióját nem tudtuk igazolni (4. ábra). A hCIAP1/2 apoptózis inhibitor fehérjék gyenge (élettani) immunreakciót mutattak, amely gátolt apoptózis folyamatra utal (4. ábra).

Megbeszélés

Megfigyeléseink további információval szolgálnak az otosclerosis gyulladásos pathogenezisét- és a különböző kórszövettani stádiumok átmeneteinek molekuláris hátterét illetően.

Az aktív otosclerosisban megfigyelhető fokozott csontremodellizáció pathogenezise jelenleg is tisztázatlan. Különösen nehéz erre magyarázatot adni az oticus capsula sajátos anyagcseréjének fényében. Az oticus capsula és a stapes talp enchondralis típusú csontosodása a születést követő egy évben fejeződik

be (1). A csontosodás befejeztével, az oticus capsulában, normális körülmények között nem észlelhető a csontrendszerre egyébként jellemző, folyamatos csontátépülés (1). Egy éves kor után a belsőfül csontos tokjában biokémiai módszerekkel sem osteoblast-sem osteoclast aktivitás nem mutatható ki (1).

Az otosclerosis kialakulásában minden bizonnyal genetikai tényezők is szerepet játszanak, de a pontos öröklésmenet máig tisztázatlan (21, 22). A családfakutatás módszerét alkalmazó epidemiológiai- és populációs genetikai vizsgálatok szerint a családlag halmozott stapes ankylosis 40-50%-os penetranciával jellemezhető autoszómális domináns öröklésmentet követ (21, 23, 24). A genetikai kapcsoltsági (*linkage*) tanulmányok nyolc otosclerosisos lókuszt (OTSC1, OTSC2, OTSC3, OTSC4, OTSC5, OTSC6, OTSC7, OTSC8) létét feltételezik, amelyek a 15q, 7q, 6p, 16q, 3q, 6q és a 9p kromoszómán helyezkednek el (21, 22). Annak ellenére, hogy ezen lókusztok feltérképezése megtörtént, hozzájuk sem gént, sem innen transzlálódott fehérjét nem sikerült kötni, ennek megfelelően nincs elképzelésünk az általuk érintett molekuláris folyamatokról (21, 23, 24). A genetikai vizsgálatok legtámadhatóbb pontja az, hogy a különböző szerzők úgy végeztek genetikai kapcsoltsági tanulmányokat, hogy a klinikailag stapes ankylosissal jellemezhető betegeket otosclerosisosnak tekintették; azonban ennek megerősítésére szövettani vizsgálatokat nem végeztek (21–24). A fenti megfontolásokon túl, a hagyományos monogénes öröklésmentet sugalmazó elméletek számos további kérdést vetnek fel: 1. minden ismert, stapes fixációhoz kapcsolódó génmutáció (pl. NOG) nem otosclerosisos stapes fixációt okoz, 2. ha valóban monogénes az öröklésment, akkor az otosclerosis miért nem gyermekkorban manifesztálódik?, 3. hogyan illeszthető a gyulladásos-osteolyticus folyamat a monogénes öröklésmentbe? 4. miért egy komplex szabályozó rendszer zavarát észleljük és miért nem egyetlen géntermék funkciózavara dominál?

Az otosclerosis genetikai hátterének legelfogadhatóbb magyarázatát a CD46-típusú kanyaróvírusreceptorok különböző *splicing* variánsainak változatos expressziója adhatja (25). A kanyaróvírus etiológiai szerepe az otosclerosis pathogenezisében az elmúlt húsz évben merült fel (1–3). A kanyaróvírus organotropizmust mutat az oticus capsula iránt, amely kizárólag a paramyxovírus receptor (CD46) izoformák sajátos kifejeződési mintázatával magyarázható. Karosi és mtsai négy új CD46 *splicing* variánst azonosítottak otosclerosisos stapes talpakban: *os1*, *os2*, *os3* és *os4* (25). Az újonnan leírt CD46 variánsokat rövidebb vagy hiányzó transzmembrán domének illetve

egy meglehetősen ritka és pathológiás jelátvitellel bíró cytoplasmaticus farok jellemzi, azonban víruskötő képességük változatlan (25). Más szerzőkhöz hasonlóan azt feltételezzük, hogy az otosclerosis pathogenezisében a legfontosabb tényező a folyamatosan kifejeződő viralis antigének által kiváltott másodlagos autoimmun reakció (1, 2). Az otosclerosis korai stádiumaiban észlelhető, fokozott I-es és II-es típusú TNF-alfa receptor expresszió a gyulladásos osteolyticus kaszkád aktiválódását eredményezi (12). Számos gyulladásos cytokin (TNF-alfa, IL-1, IL-2, IL-6, TGF- β) és csontspecifikus szabályozó fehérje (*osteoprotegerin* [OPG], *bone morphogenetic protein* [BMP], *dystrophic dysplasia sulfate transporter* [DDST]) további másodlagos szerepet játszhat ebben a folyamatban (4, 5, 26, 27).

Jelen megfigyeléseink jól illeszkednek az osteoclast-TNF-alfa-RANK tengely molekuláris szintű interakcióinak korábban leírt zavarához. A hCIAP1 és a hCIAP2 fehérjék fokozott expressziója lehet a molekuláris válasz az aktív otosclerosisban megfigyelt, NK-sejtek és osteoclastok által mediált intenzív TNF-alfa felszabadulásra. A TNF-alfa hozzákötődik a saját ún. decoy receptoraihoz (TNFR1 és TNFR2), aktiválja a TNF-alfa receptor asszociált faktorokat (TRAF1 és TRAF2) és a változatos *death* domének aktivációjával feltartóztathatatlanul elindítja a programozott sejthalál folyamatát. Az apoptózis inhibitor fehérjék nem lépnek közvetlen kapcsolatba a TNF-alfával és a TNF-alfa receptorokkal, azonban biológiai hatásait közvetve a TRAF1 és a TRAF2 inaktivációjával gátolják (14, 19). Ezenkívül a hCIAP1 és a hCIAP2 közvetlenül képes a TNF-alfa receptor által aktivált kaszpáz-3 és kaszpáz-7 fehérjékhez kötődni, teljes mértékben gátolva ezzel proteolyticus aktivitásukat (13). Az apoptózis inhibitor fehérjék pathológiásan megemelkedett expressziója végül fokozott sejt-túlélést, sejtproliferációt és kiterjedt osteoclast aktivációt okoz (5. ábra). Korábbi tanulmányok szerint egy aktív otosclerosisos góc átlagos élettartama 5–7 év között mozog (1, 4, 5). Ezen időszak alatt a TNF-alfa- és a következményes hCIAP válasz lassan kimerül, amely az otosclerosisos góc csökkenő vascularisációjában és az osteoclastok inaktivációjában nyilvánul meg (5. ábra). Az osteoid alapállomány mennyisége megnő, az osteolyticus lacunák és a pseudovascularis terek beszűkülnek. A csökkenő aktivitású otosclerosisos góc perivascularis tereiben az aktivált NK-sejtek és a CD8 pozitív cytotoxicus T-lymphocyta további akkumulációt mutatnak. Ez a stádium az otosclerosis szövettani értelemben vett gyógyulása (*“histological healing”*) (1); azonban molekuláris szinten sejtdestrukciónak zajlik, amely az NK-sej-

tek és cytotoxicus T-sejtek által felszabadított granzyme-b-nek és perforinoknak köszönhető (5. ábra). Elkezdődik az immun-mediált apoptózis molekuláris kaszkádja, miközben a fokozódó osteoprotegerin felszabadulás további calcificatiót eredményez (5. ábra). A cementvonalak fonatos, koncentrikus szerkezete az inaktív otosclerosisra jellemző lamellaris mintázatba megy át. A felfokozott csontátépülés végpontja az osteoid alapállomány sejtes elemeinek eltűnését eredményező apoptózis (kiégett otosclerosis) (12) (5. ábra). Visszatérve korábbi és jelenlegi eredményeinkhez, hangsúlyozzuk, hogy az otosclerosisos és a nem-otosclerosisos stapes fixációk etiopathogenezise teljes mértékben különbözik (4, 5, 12).

Jelen megfigyeléseink alátámasztják a TNF-alfa és a TNF-alfa által előidézett apoptózis központi szerepét az otosclerosisban észlelhető gyulladásos csontátépülés pathogenezisében. Mivel az otosclerosisos csontban proinflammatorikus citokinek – elsősorban TNF-alfa – termelődnek, biológiai szerek (anti-TNF-alfa antitest) helyi vagy szisztémás alkalmazása szóba jöhet az otosclerosis aktív stádiumait kísérő szenzori-neurális halláscsökkenés kezelésében (28–31).

Következtetések

Összefoglalva, az otosclerosis az emberi oticus capsula összetett csontremodellizációs zavara, melynek oka a sejt-túlélés és az apoptózis közötti egyensúly megbomlása lehet. A perzisztens kanyaróvírus-fertőzés, autoimmun-gyulladásos folyamatok, hormonális- és metabolikus tényezők ugyancsak szerepet játszhatnak az otosclerosis pathogenezisében. Mivel az otosclerosis diagnózisa továbbra is az eltávolított stapes talpak kórszövettani vizsgálatán alapul, prospektív, párhuzamosan végzett szövettani- és molekuláris biológiai tanulmányok szükségesek a betegség hátterének feltérképezéséhez. Ezek a jövőbeni tanulmányok elengedhetetlenül fontosak annak érdekében, hogy megtaláljuk az otosclerosisot kísérő szenzori-neurális halláscsökkenés legmegfelelőbb gyógyszeres kezelését.

Köszönetnyilvánítás

Munkánk az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA PD75371) és a Debreceni Egyetem Mecenatúra Pályázatának (DE OEC Mec 17/2008) anyagi támogatásával készült.

Irodalomjegyzék

- Chole RA, McKenna MJ. Pathophysiology of otosclerosis. *Otol Neurotol.* 22(2), 249-257, 2001.
- Arnold W, Niedermeyer HP, Lehn N, Neubert W, Höfler H. Measles virus in otosclerosis and the specific immune response of the inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 116, 705-709, 1996.
- McKenna MJ, Kristiansen AG, Haines J. Polymerase chain reaction amplification of measles virus sequence from human temporal bone sections with active otosclerosis. *Am J Otol.* 17(6), 827-830, 1996.
- Karosi T, Kónya J, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J, Szalmás A, Sziklai I. Codetection of measles virus and tumor necrosis factor-alpha mRNA in otosclerotic stapes footplates. *Laryngoscope.* 115(7), 1291-1297, 2005.
- Karosi T, Jókay I, Kónya J, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J, Szalmás A, Sziklai I. Detection of osteoprotegerin and TNF-alpha mRNA in ankylotic stapes footplates in connection with measles virus positivity. *Laryngoscope.* 116(8), 1427-1433, 2006.
- Fujioka M, Kanzaki S, Okano HJ, Masuda M, Ogawa K, Okano H. Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea. *J Neurosci Res.* 83(4), 575-583, 2006.
- Papp Z, Rezes S, Jókay I, Sziklai I. Sensorineural hearing loss in chronic otitis media. *Otol Neurotol.* 24(2), 141-144, 2003.
- Répássy G, Czigler J, Lapis K. A stapes talp, szár és fejecs felszíni elváltozásainak összehasonlító vizsgálata otosclerosisban – adatok az otosclerosisos belsőfül-károsodás pathomechanizmusához. *Fül-orr-gégegyógy.* 26, 201-209, 1980.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10(1), 45-65, 2003.
- Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science.* 296(5573), 1634-1635, 2002.
- Karin M, Gallagher E. TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF6 signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunol Rev.* 228(1), 225-240, 2009.
- Csomor P, Sziklai I, Karosi T. TNF-alpha receptor expression correlates with histologic activity of otosclerosis. *Otol Neurotol.* – elfogadva közlés alatt (Epub ahead of print, 2009. október 7.), 2009.
- Wang L, Du F, Wang X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell.* 133(4), 693-703, 2008.
- Vince JE, Pantaki D, Feltham R, Mace PD, Cordier SM, Schmukle AC, Davidson AJ, Callus BA, Wong WW, Gentle IE, Carter H, Lee EF, Walczak H, Day CL, Vaux DL, Silke J. TRAF2 must bind to cIAPs for TNF to efficiently activate NF- κ B and to prevent TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem.* – elfogadva közlés alatt (Epub ahead of print, 2009. október 13.), 2009.
- Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL, Plenchette S, Simard C, Enwere E, Arora V, Mak TW, Lacasse EC, Waring J, Korneluk RG. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(33), 11778-11783, 2008.
- Vischioni B, van der Valk P, Span SW, Krut FA, Rodriguez JA, Giaccone G. Expression and localization of inhibitor of apoptosis proteins in normal human tissues. *Hum Pathol.* 37(1), 78-86, 2006.
- Bertrand MJ, Doiron K, Labbé K, Korneluk RG, Barker PA, Saleh M. Cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors NOD1 and NOD2. *Immunity.* 30(6), 789-801, 2009.
- Jin HS, Lee DH, Kim DH, Chung JH, Lee SJ, Lee TH. cIAP1, cIAP2, and XIAP act cooperatively via nonredundant pathways to regulate genotoxic stress-induced nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res.* 69(5), 1782-1791, 2009.

19. Reardon C, Mak TW. cIAP proteins: keystones in NOD receptor signal transduction. *Immunity*. **30**(6), 789-801, 2009.
20. Conte D, Holcik M, Lefebvre CA, Lacasse E, Picketts DJ, Wright KE, Komeluk RG. Inhibitor of apoptosis protein cIAP2 is essential for lipopolysaccharide-induced macrophage survival. *Mol Cell Biol*. **26**(2), 699-708, 2006.
21. Moumoulidis I, Axon P, Baguley D, Reid E. A review on the genetics of otosclerosis. *Clin Otolaryngol*. **32**(4), 239-247, 2007.
22. Van Den Bogaert K, Govaerts PJ, De Leenheer EM, Schatteman I, Verstreken M, Chen W, Declau F, Cremers CW, Van De Heyning PH, Offeciers FE, Somers T, Smith RJ, Van Camp G. Otosclerosis: a genetically heterogeneous disease involving at least three different genes. *Bone*. **30**(4), 624-630, 2002.
23. Thys M, Van Den Bogaert K, Iliadou V, Vanderstraeten K, Dieltjens N, Schrauwen I, Chen W, Eleftheriades N, Grigoriadou M, Pauw RJ, Cremers CR, Smith RJ, Petersen MB, Van Camp G. A seventh locus for otosclerosis, OTSC7, maps to chromosome 6q13-16.1. *Eur J Hum Genet*. **15**(3), 362-368, 2007.
24. Bel Hadj Ali I, Thys M, Beltaief N, Schrauwen I, Hilgert N, Vanderstraeten K, Dieltjens N, Mnif E, Hachicha S, Besbes G, Ben Arab S, Van Camp G. A new locus for otosclerosis, OTSC8, maps to the pericentromeric region of chromosome 9. *Hum Genet*. **123**(3), 267-272, 2008.
25. Karosi T, Szalmás A, Csomor P, Kónya J, Petkó M, Sziklai I. Disease-associated novel CD46 splicing variants and pathologic bone remodeling in otosclerosis. *Laryngoscope*. **118**(9), 1669-1676, 2008.
26. Imauchi Y, Lombé M, Lainé P, Sterkers O, Ferrary E, Grayeli AB. Glucocorticoids inhibit diastrophic dysplasia sulfate transporter activity in otosclerosis by interleukin-6. *Laryngoscope*. **116**(9), 1647-1650, 2006.
27. Lehnerdt G, Unkel C, Metz KA, Jahnke K, Neumann A. Immunohistochemical evidence of BMP-2, -4 and -7 activity in otospongiosis. *Acta Otolaryngol*. **128**(1), 13-17, 2008.
28. Sziklai I. Human otosclerotic bone-derived peptide decreases the gain of the electromotility in isolated outer hair cells. *Hear Res*. **95**(1-2), 100-107, 1996.
29. Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Tumor necrosis factor-alpha, an initiator, and etanercept, an inhibitor of cochlear inflammation. *Laryngoscope*. **112**(9), 1627-1634, 2002.
30. Cohen S, Shoup A, Weisman MH, Harris JP. Etanercept treatment for autoimmune inner ear disease: results of a pilot placebo-controlled study. *Otol Neurotol*. **26**(5), 903-907, 2005.
31. Street I, Jobanputra P, Proops DW. Etanercept, a tumour necrosis factor alpha receptor antagonist, and methotrexate in acute sensorineural hearing loss. *J Laryngol Otol*. **120**(12), 1064-1066, 2006.

Zusammenfassung: Az otosclerosis az emberi oticus capsula gyulladásos csontátépülési zavara, amelyet a sejtosttódás- és az apoptózis-, tumor nekrosis faktor-alfa által létrehozott szabályozási zavara jellemezhet. Az otosclerosis kórszövettani jellegzetességeit az elmúlt évtizedekben részletesen tanulmányozták és leírták, azonban a különböző kórszövettani- és klinikai stádiumokban észlelhető osteoclast-osteoblast anyagcserezavar molekuláris biológiai jellemzése még nem fejeződött be. Negyven stapedectomy során eltávolított, ankyloticus stapes talp (N=40, férfiak=17, nők=23) kórszövettani vizsgálatát végeztük el:

hagyományos hematoxylin-eozin festést és hCIAP1/2- (apoptózis inhibitor) valamint granzyme-b (apoptózis induktor) specifikus immunofluoreszcens vizsgálatot végeztünk. Negatív kontrollként négy darab egészséges stapes talpat alkalmaztunk, melyeket eseménytelen fülészeti anamnézissel rendelkező cadaverekből távolítottunk el. Az aktív otosclerosist (N=19) a hCIAP1/2 apoptózis inhibitor fehérjék rendkívül erős immunreakciója jellemezte, ezzel szemben a granzyme-b specifikus immunreakció elhanyagolható jelölődést mutatott. Az inaktív otosclerosis (N=8) esetén lényegében fordított immunreakciót tapasztaltunk, hiszen a granzyme-b erőteljes expressziója mellett a hCIAP1/2 specifikus immunreakció hiányzott. A nem-otosclerosisos stapes fixációk (N=13) és a negatív kontrollként használt stapes talpak (N=4) nem adtak értékelhető granzyme-b specifikus reakciót, azonban a hCIAP1/2 komplex expressziója finomszemcsés cytoplasmaticus festődés formájában megfigyelhető volt. Az apoptózist gátló és serkentő fehérjék kifejeződési szintje és mintázata statisztikailag is erőteljes összefüggést mutatott a stapes ankylosis szövettani diagnózisával és ezen belül az otosclerosis kórszövettani aktivitásával (χ^2 -próba, $p < 0,05$). Az otosclerosis aktív és inaktív stádiumaiban ellentétesen és szokatlan mértékben kifejeződő apoptózis inhibitor (hCIAP1/2) és induktor (granzyme-b) fehérjék a sejt-túlélés és az apoptózis szabályozási zavarára utalnak.

KULCSSZAVAK: apoptózis, granzyme-b, hCIAP1/2, nem-otosclerosisos stapes fixáció, otosclerosis, sejt-túlélés