

DOTÉ Fül-Orr-Gégeklinika (igazgató: Prof. Dr. Répássy Gábor)*

DOTÉ Patológiai Intézet (igazgató: Prof. Dr. Gomba Szabolcs) közleménye

A belsőfül immunhisztokémiai vizsgálata krónikus középfülgyulladás esetében

DR. JÓKAY ISTVÁN*, DR. PAPP ZOLTÁN*, DR. DEZSŐ BALÁZS**,
DR. SOÓS GYÖRGYIKE**, DR. RÉPÁSSY GÁBOR*

Közlésre érkezett: 1997. 04. 01.

Kulcsszavak: anti Leu-11, immunhisztokémia, krónikus otitis media,
monocyta-macrophag marker 25 F9, 27E10, percepció halláscsökkenés.

ÖSSZEFOGLALÁS

Szerzők tíz középfülgyulladásban szenvedett beteg cochleájának post mortem vizsgálatát végezték monoklonális, a monocyta/macrophag rendszer kimutatására szolgáló ellenanyagokkal, immunhisztokémiai módszerrel, választ keresve arra, hogy a középfülgyulladás egyidejű fennállása okoz-e a belsőfülben direkt immunstimulációt, illetve immunhisztokémiai kimutatható elváltozásokat. A kísérletek során a normál cochleában sem az úgynevezett nyugvó, sem az aktivált macrophag populáció nem kimutatható. Negatív eredményt kaptak a natural killer sejtek kimutatására szolgáló anti Leu-11-markerral is. Három csontminta esetében kaptak pozitív festődést 27E10-re. A pozitivitást a basilaris membrán mesotheliális elemeiben detektálták.

BEVEZETÉS

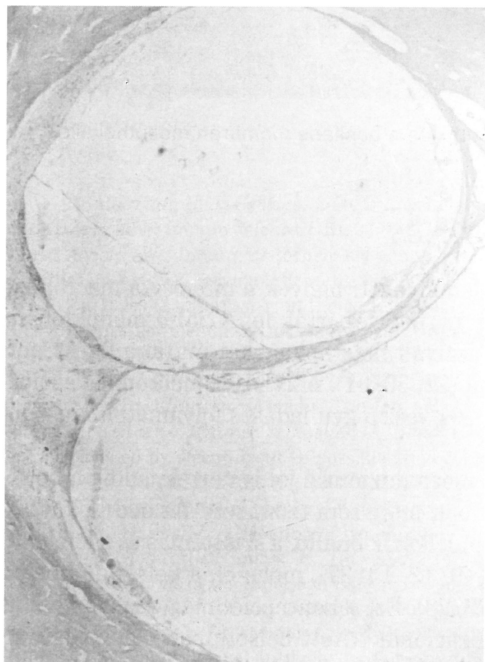
A középfül akut és krónikus gyulladásos folyamatainak hatása a cochlearis funkcióra régen vitatott téma a fül-orr-gégészeti irodalomban. Számos szerző, terjedelmes beteganyag audiológiai leletei alapján egyértelműen szignifikáns percepció hallásvesztéséről számol be mind akut, mind krónikus otitisek esetében (5, 6, 7, 15, 16, 18, 19, 21, 26, 29). Mások nem találtak a középfülgyulladásra visszavezethető szignifikánsan nagyobb idegi eredetű halláscsökkenést (17, 20). Morizono és munkatársai állatkísérletekben kimutatták, hogy az experimentálisan kiváltott purulens otitis media percepció küszöbemelkedést eredményez (18). Az audiológiai adatokon túlmenően azonban, a szokványos patológiai és hisztokémiai vizsgálatokkal nem sikerült olyan objektív elváltozásokat megállapítani, melyek magyarázhatnák a feltételezetten középfülgyulladás talaján kialakult cochlearis károsodást (15). Jelen vizsgálataink során tíz középfülgyulladásban szenvedett beteg cochleájának post mortem vizsgálatát végeztük monoklonális, a monocyta/macrophag rendszer kimutatására szolgáló ellenanyagokkal, immunhisztokémiai módszerrel. Kontrollként tíz, gyulladás patológiai jeleit nem mutató temporális csont szerepelt. Szerettünk volna arra választ kapni, vajon a monocyta/macrophag rendszer elemei kimutathatók-e a normál cochleában, illetve középfülgyulladás esetében a feltételezetten immunstimulációnak kitett cochleában.

ANYAG ÉS MÓDSZER

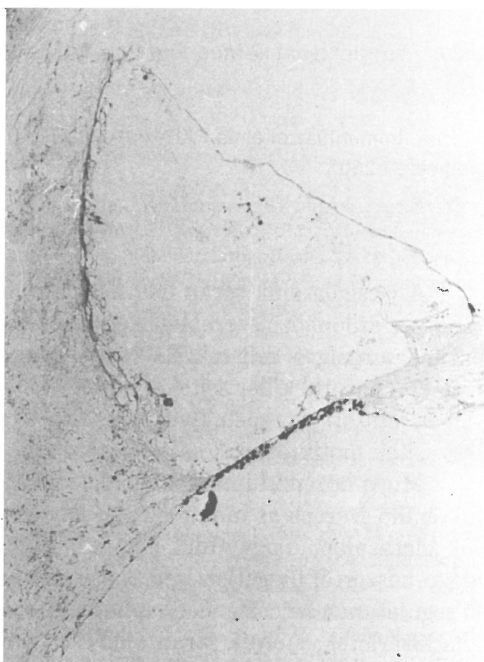
Vizsgálatainkban 20 temporális csontot dolgoztunk fel, melyeket autopszia során, 6–20 órával a halál beállta után távolítottunk el, a klasszikus Schuknecht módszerrel (24). A betegek életkora 5–75 év között volt. Tíz temporális csont esetében a sectio középfülgyulladászt igazolt, míg a másik tíz mintában nem voltak gyulladásra utaló jelek. Audiológiai adatok nem álltak rendelkezésre. A temporális csontok eltávolítása után a cochleát a korábban leírtak szerint perfundáltuk, fixáltuk és dekalcináltuk (14).

IMMUNHISZTOKÉMIA

A paraffinba ágyazott blokkokból 4μ vastagságú metszetek készültek. Deparaffinálás után az immunhisztokémiai vizsgálatra kiválasztott metszeteket a Shi és munkatársai által közölteknek megfelelően mikrohullámmal érzékenyítettük (25). A metszeteket 3%-os H_2O_2 oldatba helyeztük az endogén peroxidase gátlása céljából 10 percre. A monocyta/macrophag sejtekre jellemző antigének kimutatására 25F9, 27E10, (Dianova, Hamburg, Germany) és antiLeu-11 (Dako) monoklonális ellenanyagokat használtuk (30, 31), a következő hígításokban 25F9:1:25, 27E10: 1:50, antiLeu-11: 1:10. Szobahőmérsékleten történő 24 órás inkubálás után a metszeteket háromszor PBS-ben (phosphat buffered saline pH 7,2) mostuk, majd az antigén-antitest kötődés kimutatására peroxidase reakciót használtuk ABC kit (Vectastain, Vector Laboratories) segítségével. Háromszori ismételt PBS mosás után, a reakciót aminoethyl-carbazollal tettük láthatóvá.



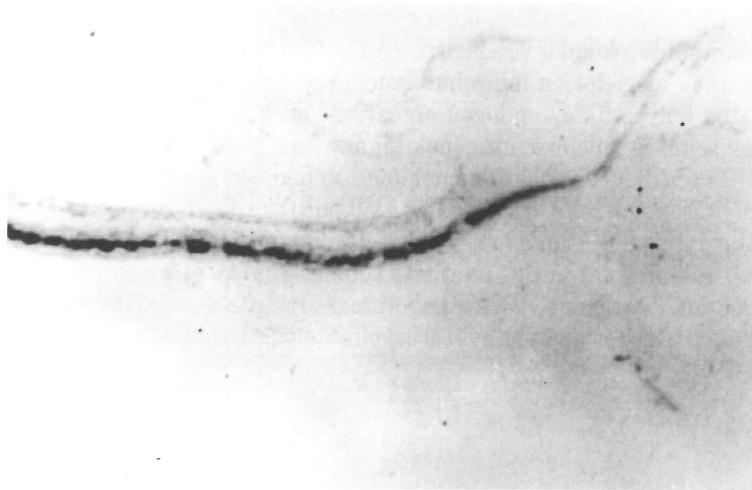
1. ábra. Normális cochlea haematoxylin-eosin festés 50X.



2. ábra. Immunhisztokémia PAP-reakció. 27E10 pozitívítás a basilaris membrán mesotheliális elemeiben 125X.

EREDMÉNYEK

A vizsgált metszetek alapján megállapítható, hogy a cochlearis struktúrák jól felismerhetők (1. ábra). A cochleában gyulladásos jelenségekre utaló elváltozások nem detektálhatók. A 20 temporális csont vizsgálata során nem találtunk pozitivitást sem a 25F9, sem az anti Leu-11 monoklonális ellenanyaggal. A vizsgált tíz, középfülgyulladás patológiai jeleit mutató csonton három csontban találtunk pozitív festődést a 27E10 ellenanyaggal. Ezekben az esetekben a pozitivitás a basilaris membrán scala tympanit határoló felszínén volt detektálható az úgynevezett tympanikus lamelláris sejtekben vagy mesothelialis elemekben (2., 3. ábra).



3. ábra. Immunhisztokémia PAP-reakció. 27E10 pozitivitás a basilaris membrán mesotheliális elemeiben 250X.

MEGBESZÉLÉS

A vizsgálataink során használt három ellenanyagot, melyek a monocyta/macrophag rendszer különböző szereplőit képesek felismerni, nemrég írták le. A 25F9 monoklonális antitest a nyugvó, míg a 27E10 ellenanyag az aktivált macrophagokat mutatja ki. Az anti Leu-11 a natural killer sejteket képes felismerni (22, 30, 31). A 27E10 a macrophag aktivációban játszott szerepén kívül feltételezetten részt vesz a gyulladásos folyamatokban érintett sejtek motilitásának szabályozásában.

Míg a középfül immunológiai védekezési mechanizmusai jól ismertek, addig a belsőfül önálló szerepe az immunológiai folyamatokban máig sem tisztázott. Az eddigi kutatások adatai alapján úgy tűnik, hogy a belsőfül rendelkezik önálló, a szisztémás és a központi idegrendszerrel független immunszisztémával (9, 12, 13, 27), melynek a belsőfülön belüli fő regulátora a saccus endolymphaticus (1, 2, 23, 28). Ezt a koncepciót megerősítik azok az állatkísérletek, melyek során a direkt immunizációnak kitett belsőfülben emelkedett ellenanyag szintet és immunkompetens sejtek megjelenését regisztrálták (8, 11, 27).

A középfül gyulladásos állapota anatómiai közelsége miatt is felveti a potenciális belsőfül károsodás lehetőségét. Ennek következtében előtérbe kerültek a kerekablak-membránnal kapcsolatos kutatások. A kerekablak membránja az egyetlen olyan lágy szövet

barrier, mely elválasztja a közép- illetve a belsőfület. A membrán szemipermeábilis tulajdonságából adódóan – főleg gyulladásos környezetben – különböző méretű és természetű kémiai anyagok átjutását teszi lehetővé a középfülből a belsőfülbé (6, 7, 16, 19, 21, 26). Ezek a toxikus hatások szolgálhatnak az élettani alapjául annak, hogy az otitisekhez gyakran percepciós halláscsökkenés is társul (1, 4, 6, 7, 10, 16, 19, 26).

Jelen kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy a középfülgulladás egyidejű fennállása okoz-e a belsőfülből direkt immunstimulációt, összehasonlítva a kontrollként fel dolgozott normális belsőfülekkel. Egyidejűleg vizsgáltuk a nyugvó és aktivált macrophagok, valamint a természetes killer sejtek kimutathatóságát normális belsőfülön. Megállapítottuk, hogy az általunk végzett kísérletek során a normál cochleában sem az úgynevezett nyugvó, sem az aktivált macrophag populáció nem volt kimutatható. Negatív eredményt kaptunk a natural killer sejtek kimutatására szolgáló anti Leu-11-el is. Három csontminta esetében kaptunk pozitív festődést 27E10-re, abból a csoportból, melyeket középfülgulladás szomszédságából távolítottunk el. A pozitivitást a basilaris membrán mesotheliális rétegében detektáltuk és egyértelműen nem macrophagok adták.

A basilaris membrán mesotheliális sejtjeinek a funkciói még nem tisztázottak, de vannak feltételezések, mely szerint fagocitáló képességgel rendelkeznek és részt vesznek a belsőfül védekező mechanismusaiban (3).

Jelen kísérleteink eredménye is e sejteknek a belsőfül védekezőmechanizmusában játszó szerepét vetik fel. A neuroepitheliális sejtek és a mesotheliális sejtek kölcsönhatásáról jelenleg nincsenek hitelt érdemlő, megbízható adatok. Amennyiben ilyen kölcsönhatást mégis feltételezünk, eredményeink újabb adatokkal szolgálnak a krónikus középfülgulladás talaján kialakuló percepciós halláscsökkenés mechanizmusának lehetséges magyarázatához.

A mezotheliális sejtek funkcióinak és kölcsönhatásainak pontos megismerése további kutatásokat igényel.

IRODALOM

1. Altermatt, H. J., Gebbers, J.-O., Müller, L., Arnold, W., Laissue, J. A.: Human endolymphatic sac: Evidence for a role in inner immun defence. *ORL* 52, 143–148, (1990).
2. Altermatt, H. J., Gebbers, J.-O., Müller, L., Laissue, J. A., Arnold, W.: Immunohistochemical characterization of human endolymphatic sac and its associated cell population. *Acta Otolaryngol* (Stockh.) 112, 299–305 (1992).
3. Angelborg, C.: Distribution of macromolecular tracer particles (Thorotrast-r) in the cochlea. An electron microscopic study in guinea pig. Part I. The organ of Corti, the basilar membrane and the tympanic covering layer. *Acta Otolaryngol. Supp.* (Stockh.) 319, 19–41 (1974).
4. Aviel, A., Ostfeld, E.: Acquired irreversible sensorineural hearing loss associated with otitis media with effusion. *Am. J. Otolaryngol.* 3 (3), 217–222, (1982).
5. Cusimano, F., Cocita V. C., Amico A. D.: Sensorineural hearing loss in chronic otitis media. *The Journal of Laryngology and Otology* 103, 158–163 (1989).
6. Engel, F., Blatz, R., Kellner, J., Palmer, M., Weller, U., Bhadki, S.: Breakdown of the round window membrane permeability barrier evoked by streptolysin O: possible etiologic role in development of sensorineural hearing loss in acute otitis media. *Infect. Immun.* 63, 1305–1310, (1995).
7. Englisch, G. M., Northern, J. L., Fria, T. J.: Chronic Otitis Media as a Cause of Sensorineural Hearing Loss. *Arch. Otolaryngol.* 98, 18–22 (1973).
8. Gloddek, B., Ryan, A. F., Harris, J. P.: Homing of lymphocytes to the inner ear. *Acta Otolaryngol.* (Stockh.) 111, 1051–1059 (1991).
9. Gloddek, B., Lamm, K., Haslov, K.: Influence of middle ear immune response on the immunological state and functions of the inner ear. *Laryngoscope.* 102, 177–181, (1992).
10. Guo, J., Wu, Y., Chen, W., Lin, J.: Endotoxin damage of the stria vascularis: the pathogenesis of sensorineural hearing loss secondary to otitis media? *The Journal of Laryngology and Otology* 108, 310–313, (1994).
11. Harris, J. P.: Immunology of the inner ear: evidence of local antibody production. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 93, 157–162 (1984).
12. Harris, J. P., Ryan, A. F.: Effect of a middle ear immune response on inner ear antibody levels. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 94, 202–206 (1985).
13. Veldman, J. E.: The immun system in hearing disorders. *Acta Otolaryngol. Suppl.* (Stockh.) 458, 67–75, (1988).
14. Jókay, I., Dezső, B., Soós, Gy., Répássy, G.: Human os temporale preparálása hisztokémiai vizsgálat céljából. *Fül-orr-gégegyógy.* 40, 219–224 (1994).
15. Keithley, E. M.,

Krekorian, T. D., Sharp, P. S., Harris, J. P., Ryan, A. F.: Comparison of immune-mediated models of acute and chronic otitis media. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 247, 247–51 (1990). – 16. Lee, S. H., Woo, H. W., Jung, T. T. K., Lee, C., Miller, S. K., Park, Y. M., Hwang, S. K.: Permeability of arachidonic acid metabolites through the round window membrane in chinichillas. *Acta Otolaryngol. Suppl. (Stockh.)* 493, 165–169 (1992). – 17. Levine, B. A., Shelton, C., Berliner, K. I., Sheehy, J. L.: Sensorineural loss in chronic otitis media. Is it clinically significant? *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 115, 814–816 (1989). – 18. Morizono, T., Geibink, G. S., Paparella, M. M., Sikora, M. A., Shea, D.: Sensorineural hearing loss in experimental purulent otitis media due to streptococcus pneumoniae. *Arch. Otolaryngol.* 111, 794–798 (1985). – 19. Munker, G.: Inner ear hearing loss in acute and chronic otitis media. *Adv. Otorhinolaryngol.* 27, 138–143 (1981). – 20. Noordzij, J. P., Dodson, E. E., Ruth, R. A., Arts, H. A., Lambert, P. R.: Chronic otitis media and sensorineural hearing loss: is there a clinically significant relation? *Am. J. Otol.* 16, 420–423 (1995). – 21. Paparella, M. M., Goycoolea, M. V., Schachern, P. A., Sajjadi, H.: Current clinical and pathological features of round window diseases. *Laryngoscope* 97, 1151–1160 (1987). – 22. Poppema, S., Bahn, A. K., Reinherz, E. L.: Distribution of T-cell subsets in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* 153, 30–41 (1981). – 23. Rudack, C.: Immunologie des Innenohres. *HNO* 43, 275–281 (1995). – 24. Schuknecht, H. F.: Temporal bone removal at autopsy. *Arch. Otolaryng.* 87, 129–137 (1968). – 25. Shi, S. R., Tandon, A. K., Haussmann, R. R. M., Klara, K. L., Taylor, C. R.: Immunohistochemical study of intermediate filament proteins on routinely processed, celloidin-embedded human temporal bone sections by using a new technique for antigen retrieval. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 113, 48–54 (1993). – 26. Stewart, T. J., Belal, A.: Surgical anatomy and pathology of the round window. *Clin. Otolaryngol.* 6, 45–62 (1981). – 27. Takahashi, M., Harris, J. P.: Analysis of immunocompetent cells following inner ear immunostimulation. *Laryngoscope* 88, 1133–1138 (1988). – 28. Tomiyama, S., Harris, J. P.: The endolymphatic sac: Its importance in inner ear immun responses. *Laryngoscope* 96, 685–691 (1986). – 29. Vartiainen, E., Karjalainen, S.: Factors influencing sensorineural hearing loss in chronic otitis media. *Am. J. Otolaryngol.* 8, 13–15 (1987). – 30. Zwadlo, G., Bröcker, E. B., Bassewitz, D. B., Feige, H., Sorg, C.: A monoclonal antibody to a differentiation antigen present on mature human macrophages and absent from monocytes. *J. Immunol.* 134, 1487–492 (1985). – 31. Zwadlo, G., Schlegel, R., Sorg, C.: A monoclonal antibody to a subset of human monocytes found only in the peripheral blood and inflammatory tissues. *J. Immunol.* 137, 512–518 (1986). –

SUMMARY

Jókay I., Z. Papp, B. Dezső, Gy. Soós, G. Répássy: *Immunohistochemical examination of the inner-ear in case of chronic otitis media*

The authors have done post mortem examinations of the cochlea of ten patients, who suffered from otitis media, with monoclonal antibodies, used to demonstrate the monocytic/macrophageal system, by immunohistochemical method. They wanted to get an answer to, whether otitis media existing at the same time causes direct immunostimulation, respectively revealable changes in the inner-ear, demonstrated with immunohistochemical methods. In the course of the examinations, either the so called static, or the activated macrophage population was not traceable in normal cochleas.

The authors got a negative result with anti Leu-11 marker too, which would have been able to demonstrate the presence of natural killer cells. There was a positive colouring with 27E10 only in three cases of bone samples. The positivity was detected in the mesothelial elements of basilar membrane.

ZUSAMMENFASSUNG

I. Jókay, Z. Papp, B. Dezső, Gy. Soós, G. Répássy: *Die immun-histochemische Untersuchung des Innenohres bei Fällen chronischer Mittelohrentzündung*

Verff. untersuchten die Innenohren von 10 Patienten mit chronischer Mittelohrentzündung post mortem mit der Fragestellung, ob eine Mittelohrentzündung im Innenohr direkte Immunstimulation bzw. immun-histochemische Veränderungen verursacht. Dazu verwendeten sie monoklonale Antigene, die dem Nachweis des Monozyten-Makrophagen-Systems dienen. In der normalen Kochlea konnten weder sog. ruhende noch aktivierte Makrophagen-Populationen nachgewiesen werden. Auch mit dem Anti Leu-11-Marker nachweisbare Natural Killerzellen wurden nicht gefunden. Bei drei Knochenproben, die aus chronisch entzündetem Os temporale entnommen worden waren, konnte eine positive Anfärbung auf 27 E 10 gefunden werden: in mesothelialen Teilen der Basilarmembran.