

Debreceni Orvostudományi Egyetem Fül-Orr-Gégeklinika

(igazgató: Prof. Dr. Répássy Gábor egyetemi tanár)

és a Patológiai Intézet**

(igazgató: Prof. Dr. Gomba Szabolcs egyetemi tanár) közleménye

Humán os temporale preparálása hisztokémiai vizsgálat céljából

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

Közlésre érk. 1993. 12. 14.

Kulcsszavak: os temporale, perilimfatikus perfúzió, fixálás, dekalcinálás.

A szerzők az os temporale preparálásának gyakorlatukban bevált metodikájáról számolnak be. Munkájuk során ismertetik az egyes metodikai lépések sorrendjét, jellemzőit. Tanulmányukat szövettani ábrákkal illusztrálják.

A halláscsökkenésben szenvedő betegek nagy száma és a halláscsökkenést okozó ismert és feltételezett etiológiai faktorok széles skálája ellenére nehéz konkrét esetben korrekt okot megjelölni, mint a halláscsökkenés kiváltóját. Ez az ellentmondásos helyzet napjainkban is a modern vizsgáló módszerek (CT, angiografia, Doppler, immunológia, virológia, audiológia) elterjedése mellett is jellemzi a gyakorlatban felmerülő problémákat. Tovább bonyolítja a pontos etiológiai faktor tisztázása terén felmerülő nehézségeket az a tény, hogy a belső fül struktúrájából adódóan a vizsgálatok során nincs mód biopsia elvégzésére és így speciális szövettani vizsgálatok segítségével információt nyerni arról, milyen vaszkularis, neurológiai, immunológiai, molekulár-biológiai elváltozások állíthatók szemben az észlelt klinikai tünetekkel. Így a halláscsökkenés diagnosztikájának felállítását követően - a legrészletesebb kivizsgálás ellenére is - a klinikus számos esetben csak találgatni képes az etiológiát illetően.

Az os temporale ill. a belső fül post mortem szövettani, immunhisztokémiai vizsgálata új lehetőséget nyújt a kutatásra, bár az e téren felmerülő problémák nem elhanyagolhatók. Ezek közül a legfontosabbak:

1. Ritkán áll rendelkezésre előzetes otológiai, audiológiai dokumentáció.
2. Az os temporale eltávolítása és a halál beállta közötti időnek a lehető legrövidebb időnek kell lennie a meginduló gyors autolízis miatt.
3. Az autolízis megakadályozására a belső fül folyadék tereit a lehető legrövidebb időn belül speciális prezerváló oldattal perfundálni kell.
4. A labirint a szervezet legkeményebb csontja.
5. Az egész procedura rendkívül időigényes, és speciális jártasságot kíván.

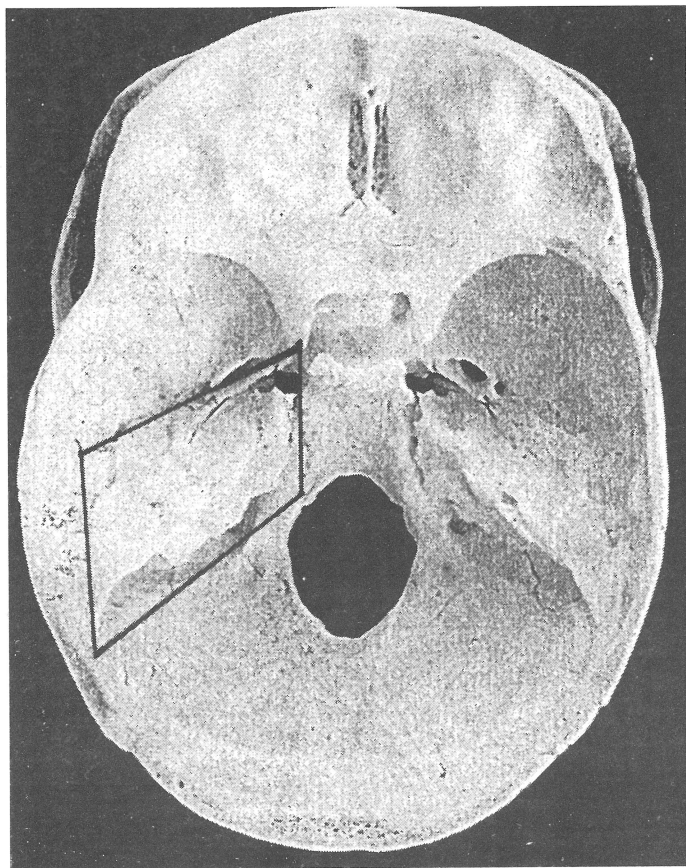
*Debreceni Orvostudományi Egyetem Fül-Orr-Gégeklinika
4012 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.

Jelen közleményünk célja, hogy az irodalmi adatok tükrében beszámoljunk az általunk bevált metodikáról.

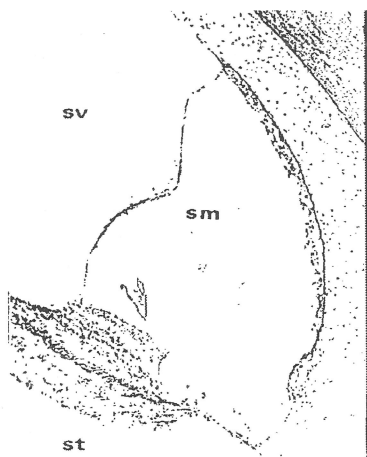
ANYAG ÉS MÓDSZER

Az os temporale kivétele

A tudományos célú kutatásra az os temporale a fekvőbeteg intézményben elhalt, autopsziára kerülő betegekből nyerjük. Ehhez előzőleg az illető intézmény etikai bizottságának az engedélye szükséges. A minta méretét meghatározza a tudományos kutatás konkrét iránya és célja. A klasszikus Schuknecht-féle blokk metodika [9.] segítségével olyan preparátumot nyerünk, melyen jól vizsgálható a középfül, a belsőfül, a tuba auditiva struktúrája is. Az agy kivételét követően átvágjuk a belső hallójárat képleteit, majd a preparátum kivétele csontfűrészsel kivitelezhető négy metszést igényel. Az I. metszés merőleges a piramis-csont hossz tengelyére az apex mentén, a II. metszés párhuzamos a par squamosával és áthalad a hallójárat porcos részén. A III. és IV. metszés a piramis csont elülső és hátulsó részétől 1 cm-re haladva összeköti az I. és II. metszési vonalakat (1. ábra). E klasszikus módszert úgy módosítottuk, hogy a minta laterális kiterjedése magába foglalja a csontos hallójáratot is, lehetővé téve speciális audiológiai vizsgálatok elvégzését is. A Schuknecht-féle blokk



1. ábra

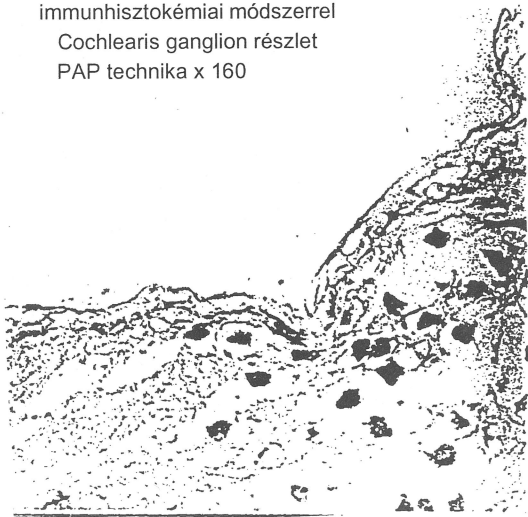


2a. Humán cochlea
Haematoxylin-eosin-festés x 40.
sm = scala media
sv = scala vestibuli
st = scala tympani

2b. Carboxipeptidase-M (CPM)
kimutatása direkt
immunhisztokémiai módszerrel.
Immunoperoxidase (PAP) technika
x 40.

2c. CPM kimutatása
direkt
immunhisztokémiai
módszerrel
Stria vascularis rész-
let
PAP technika x 160

3. ábra. CPM kimutatása direkt
immunhisztokémiai módszerrel
Cochlearis ganglion részlet
PAP technika x 160



metodikának számos variációja van, mely az eltávolított csont nagyobb méreténél fogva lehetővé teszi, egyéb a vizsgáló számára fontos struktúrák tanulmányozását is, így lehetőség nyílik pl. a tensor és levator veli palatini vagy a centrális hallópályák vizsgálatára is [8.].

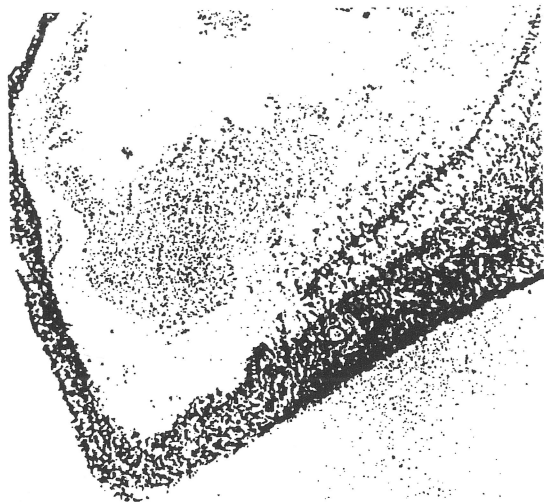
Időfaktor

A temporalis csont eredményes feldolgozásának meghatározó eleme a halál beállta és a csont kivétele között eltelt idő intervallum. A halál beállta után a szervezetben megindult gyors autolízis a kutatás szempontjából alkalmatlanná teszi a nagyon érzékeny, finom belső fül struktúrákat a vizsgálatra. Az optimális

idő 3-6 óra, de megfelelő hűtéssel ez az idő elérheti a 20 órát is, számottevő károsodás nélkül.

A perfúzió kérdése

A halál beállta után gyors autolízis szükségessé teszi a belső fül finom struktúrájának gyors fixálását. Erre a legjobb módszer a minél korábban elvégzett perilimfatikus perfúzió, melynek során különböző fixáló folyadékokat juttathatunk a perilimfatikus térbe. A gyakor-



4. ábra. CPM kimutatása immunhisztokémiai módszerrel a macula utriculi neuroepithelialis elemeiben.

PAP technika x 160

latban mikroszkóp segítségével a dobhártyát előre hajtjuk, és eltávolítjuk az útban lévő incust és stapest. Finom horoggal perforáljuk a kerekablakot és az ovális ablakot fedő membránt, majd tuberculin fecskendő segítségével kb. 10-15 ml fixáló folyadékot juttatunk 0,5 ml/min. sebességgel a perilimfatikus térbe, vigyázva arra, hogy a nyomás ne rupturálja a belső fül hártás képleteit és ne kerüljön légbuborék a perilimfatikus térbe. A különböző vizsgálati technikák más és más fixáló folyadékot igényelnek. Gyakran használt fixáló folyadékok a Karnovszky (2% glutaraldehyd, 1% paraformaldehid) és a Britta (5% glutaraldehyd, 8% paraformaldehid, osmium tetraoxid) [1., 3., 5.]. Gyakorlatunkban jól bevált a 4%-os paraformaldehiddel való fixálás.

Dekalcinálás

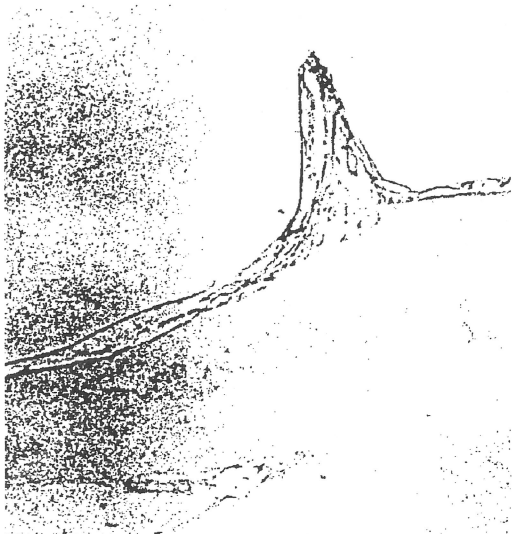
Az oticus kapszula a szervezet legkeményebb csontja. Szövettani feldolgozásra csak akkor válik alkalmassá, ha előzetesen dekalcináljuk. A gyakorlatban a már fixált csontmintát elektromos fűróval a kívánt optimális méretre megkisebbitjük, majd dekalcináló oldatba helyezzük. Leggyakrabban használt dekalcináló anyagok a 10%-os EDTA (aethylen diamin tetraacetát) oldat, 5%-os Trichloracetat oldat. Gyors dekalcinálást eredményez, de szöveti károsodást okozó hatása miatt hisztokémiai feldolgozásra alkalmatlan az RDO (Rapid decalcifer) készülékkel való dekalcinálás [1., 2., 6.]. Az antigenitást legkevésbé károsító EDTA oldattal a dekalcinálás 8-18 hétig tart. Rövidebb dekalcinálási időt értünk el az 5%-os Trichloracetat oldat alkalmazása során (6-8 hét) az antigenitás károsodása nélkül.

Beágyazás

A fixáláson és a dekalcináláson átment mintákat emelkedő koncentrációjú alkoholban dehidráljuk és megfelelő orientálás [12.] után paraffinba ágyazzuk. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz mikrotommal 4-5 m vastagságú metszeteket készítünk, majd xylolban történő deparaffinálás után, csökkenő koncentrációjú alkoholban rehidráció következik. Minden tizedik metszetet hematoxin-eozinnal festünk, míg a natív metszeteket - Shi és munkatársai [11.] által leírt mikrohullámú antigén előhívó technikával érzékenyítjük.

EREDMÉNYEK

Az os temporale immunhisztokémiai vizsgálatokra is alkalmas preparálásának fent leírt módszereinek eredményességét öt saját készítésű szövettani ábrával demonstráljuk (2/a, 2/b, 2/c, 3., 4., 5. ábra). Megállapítható, hogy a szövettani metszeteken jól elkülöníthetők a belső fül cochlealis és vestibularis részének strukturái. A cochleát tartalmazó metszeteken jól ki-vehetők a scala vestibuli, a scala media, a scala tympani, a stria vascularis, a Reissner membran és a Corti-szerv. Az utriculust és a crista ampullarist bemutató ábrán a recepto-rok neuroepithelialis elemei láthatók. A metodika az immunhisztokémiai vizsgálatokra is



5. ábra. CPM pozitivitás a crista ampullaris neuroepitheliumaiban
PAP technika x 40

alkalmas, amit a Carboxypeptidase-M kimutatásával demonstráltunk. A Carboxypeptidase-M a szervezetben széles körben előforduló enzim, melynek pontos funkciói még nem ismertek, de feltételezik, hogy szerepük van a neurotransmitterek regulációjában.

MEGBESZÉLÉS

A humán temporalis csont preparálásának tudományos célja olyan ismeretek megszerzése, melyek közelebb viszik a kutatókat a hallás és egyensúlyozó szerv be-

tegségeinek patológiai alapjainak megértéséhez. A teljes igényű klinikai kezelésgyógyítás kívánatos feltétele, hogy a modern audiológiai, vestibularis illetve kiegészítő vizsgálatok mellett - legalábbis a centrumokban - foglalkozzanak a diagnosztizált betegségek patológiai alapjainak mind szélesebb körű megismerésével is. Ilyen célból jöttek létre a világ ismert nagy os temporale kutató központjai is Amerikában, Japánban, Németországban, Svájcban. Ezekben a központokban több száz temporalis csontot tartalmazó bankok állnak rendelkezésre az előzetes gyűjtő és kutató munka következményeként [3., 10.]. Magyarországon jelenleg ilyen jellegű kutató központok tudomásunk szerint nincsenek, bár a temporalis csonton végzett műtéti gyakorlatok a legtöbb fül-orr-gégészeten bevezető, kötelező tevékenység a szakorvos jelöltek számára a betegeken végzendő fülműtétek előtt. Az os temporale preparálása anatómiai demonstráció, sebészeti tréning céljából már régen leírt és alkalmazott eljárás. Schuknecht már 1968-ban részletes áttekintést ad a metodikáról, de a napjainkban is megjelenő nagyszámú közlemény mutatja az ezen a téren is végbemenő állandó fejlődést [4., 7.]. A patológiai vizsgáló módszerek fejlődése (hisztokémia, immunhisztokémia, elektronmikroszkóp) szükségessé tette, hogy az os temporale preparálása során új technikákat alkalmazzanak, melynek során az egyébként agresszív fixáló és dekalcináló ágensek mellett olyan új anyagokat használjanak, melyek lehetőleg nem károsítják a finom belső fül struktúrák szöveti antigenitását. A preparálás során használt anyagok megválasztása függ az alkalmazni kívánt technikától és a vizsgálat irányától. Ennek megfelelően a témának kiterjedt irodalma van. Közleményünkben egy olyan, általunk sikerrel alkalmazott metodikáról számolunk be, melynek során 4%-os paraformaldehiddel történő fixálás és 5%-os trichloracetát oldattal való dekalcinálás után alkalmazva a Shi és munkatársai által leírt mikrohullámú antigén érzékenyítő eljárást, immunhisztokémiai vizsgálatra is alkalmas szövettani preparátumokat nyertünk.

IRODALOM

1. Altermatt, H. J., Gebbers, J. O., Arnold, W., Kraft, R., Laissue, J. A.: Preparation of Human Temporal Bone for Immunohistochemical Investigation. ORL 51., 83-87., (1989.).
2. Arnold, W.: Possibilities of

Immunohistochemical Investigation on Human Temporal Bone. Acta Otolaryngol (Suppl.), (Stockh.), (Suppl. 436): 62-68. (1987.). - 3. *Bluestone, C. D., Naunton, R. F.*: Human Temporal Bone Research Workshop Report. Annals of Otolaryngology and Laryngology 98., Suppl. 1-56., (1989.). - 4. *Golding-Wood, D. G.*: Temporal bone dissection for display. The J. of Laryngology and Otolaryngology 108., 3-8., (1994.). - 5. *Engström, B., Hillerdal, M., Hillerdal, G.*: Preservation of the Human Cochlea with Two Different Fixatives. Acta Otolaryngol. (Stockh.) 470., 31-33., (1990.). - 6. *Huizing, E. H., Veldman, J. E., Meeuwse, F.*: Progress in Temporal Bone histopathology. Acta Otolaryngol (Suppl.), (Stockh.), (suppl.), 423., 24-28., (1985.). - 7. *Natarajan, B., Baxter, A.*: Preparation of temporal bone exhibit. The J. of Laryngology and Otolaryngology 108., 9-12., (1994.). - 8. *Sando, I., Doyle, W. J., Okuno, H., Takahara, T., Kitajiri, M., Coury, W. J.*: A method for the histopathological analysis of the temporal bone and the eustachian tube and its accessory Structures. Ann. Otol-Rhinol-Laryngol. 95., 267-274., (1986.). - 9. *Schuknecht, H.*: Temporal Bone Removal at Autopsy Arch. Otolaryng. 87., 33-41., (1968.). - 10. *Schuknecht, H. F.*: Temporal Bone collections in Europe and the United States: Observations on a productive laboratory, pathologic findings of clinical relevance and recommendations. Ann. Otol-Rhinol-Laryngol. 96., Suppl. 130., (1987.). - 11. *Shi et al.*: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. J. Histochem. Cytochem. 39., 741-748., (1991.). - 12. *Sick, H., Veillon, F.*: Atlas of Slices of the Temporal Bone and Adjacent Region. J. F. Bergmann Verlag München, 1988. -

ZUSAMMENFASSUNG

I. JÓKAY, B. DEZSŐ, GY. SOÓS, G. RÉPÁSSY: *Die Präparierung des menschlichen Untersuchung*

Verff. berichten über die bei ihnen bewährte Methodik zur Präparation des Os temporale, über die Reihenfolge und Kennzeichen der einzelnen methodischen Schritte. Histologische Abbildungen illustrieren die Arbeit.

SUMMARY

I. JÓKAY, B. DEZSŐ, GY. SOÓS, G. RÉPÁSSY: *Preparation of human temporal bone for the purpose of histochemical examination*

The authors give account of preparation methodology of human temporal bone well proved in their practice. In the course of their paper, they write about sequences of single methodological steps and their characteristic features. Their study is illustrated with histological pictures.

Személyi hírek:

Prof. Dr. Ribári Ottót

az Osztrák Fül-orr-gege Egyesület tiszteletbeli tagjává választotta.

Prof. Dr. Répássy Gábort

a Collegium Otorhinolaryngologicum Amicitiae Sacrum tagjává választotta.