

A TNF-alfa receptor expresszió összefügg az otosclerosis szövettani aktivitásával

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

ÖSSZEFOGLALÁS: Az otosclerosis az emberi *oticus capsula* gyulladásos csontátépülési zavara, melyet változatos mértékű TNF-alfa receptor expresszió és egyedi receptor eloszlási mintázat jellemezhet. Az elmúlt évtizedekben az otosclerosis kórszövettani jellemvonásait részletesen leírták; azonban a betegség klinikai és kórszövettani stádiumait illetően nincs egyértelműen megfeleltethető molekuláris biológiai stádiumbeosztás, különös tekintettel a kórosan felfokozott aktivitású osteoclast-osteoblast tengelyt illetően. Negyven otosclerosisos és negyven nem-otosclerosisos, *ankyloiticus* stapes talpat vizsgáltunk (N=80, férfiak=29, nők=51): hagyományos hematoxylin-eozin festést, valamint tumor nekrosis faktor-alfa receptor I és II (TNFR1/II) specifikus immunofluoreszcens vizsgálatot végeztünk. Az aktív otosclerosist (I–II fokozat, N=24) a TNFR2 fokozott expressziója jellemezte, ezzel szemben az inaktív esetekben (III–IV fokozat, N=16) a TNFR1 emelkedett expresszióját tapasztaltuk, ezenkívül a TNFR2 specifikus immunreakció teljesen hiányzott. A nem-otosclerosisos stapes fixációk teljesen elhanyagolható mértékű TNFR kifejeződést mutattak. A TNFR expressziós mintázat statisztikailag szignifikáns összefüggést mutatott az otosclerosis kórszövettani aktivitásával (χ^2 -próba, $p < 0,001$). Az otosclerosisos mintákban észlelt, emelkedett TNFR expresszió az osteoclastok élénk anyagcseréjét, valamint a gyulladásos útvonalak aktiválódását igazolja. Eredményeink alátámasztják az otosclerosisos és a nem-otosclerosisos stapes fixációk etiopathogenezisének markáns elkülöníthetőségét. Mindezek alapján a klinikai gyakorlatban megfontolandó lehet a monoklonális anti-TNF-alfa antitestek alkalmazása az otosclerosis korai, aktív esetekben.

KULCSSZAVAK: gyulladás, nem-otosclerosisos stapes fixáció, otosclerosis, tumor nekrosis faktor-alfa, tumor nekrosis faktor-alfa receptorok

SUMMARY: Otosclerosis is an inflammatory bone remodeling disorder of the human *otic capsule*, which might be characterized by variable levels and unique expression pattern of TNF-alpha receptors. Histological characteristics of otosclerosis have been well described during the last 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 otosclerotic- and forty non-otosclerotic *ankyloitic* stapes footplates (N=80, males=29, females=51) were histologically analyzed: conventional hematoxylin-eosin staining and Tumor Necrosis Factor-alpha receptor I and II (TNFR1/II) specific immunofluorescent assay were performed. Active otosclerosis (Grade I–II, N=24) was featured by increased expression of TNFR2 and moderate expression of TNFR1; inactive cases (Grade III–IV) were characterized by permanent expression of TNFR1; however, TNFR2 specific immunoreaction was absent. Non-otosclerotic stapes specimens showed a negligible TNFR expression. TNFR expression pattern showed a strong correlation with the histological activity of otosclerosis (χ^2 test, $p < 0.001$). Detection of elevated TNFR expression demonstrates activated osteoclast metabolism and inflammatory pathways in otosclerosis. Different etiopathogenesis of otosclerotic and non-otosclerotic stapes ankylosis should be distinguished. Administration of monoclonal anti-TNF-alpha antibody may be a reasonable option in the medical treatment of active stages of otosclerosis.

KEYWORDS: inflammation, non-otosclerotic stapes fixation, otosclerosis, tumor necrosis factor alpha, tumor necrosis factor alpha receptors

Közlésre érkezett: 2009.00.00.

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

Cím: 4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.,

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

E-mail: karositas@gmail.com

Web: www.earpathology.eu

BEVEZETÉS

Az otosclerosis az emberi *oticus capsulában* zajló gyulladásos csontátépülési zavar, amely a stapes fixáció és az endostealis érintettséggel járó cochlearis csontfelszívódás révén progresszív vezetési- és/vagy szenzorineurális halláscsökkenést okoz (1). Az otosclerosisra jellemző kórszövettani elváltozásokat már a XIX. század fordulójától kezdve részletesen tanul-

mányozták és leírták, azonban az otosclerosis pathogeneze részleteiben tisztázatlan maradt (1, 2). A jellegzetes otosclerosisos góccok kizárólag az *oticus capsulában* jelennek meg (2, 3). Az otosclerosisos góccok elhelyezkedése igen változatos, leggyakrabban a stapes talpban (95%) és az ovális- (90%), valamint a kerekablak (40%) környékén jelentkeznek, ritkábban a félkörös ívjáratok mentén (15%) (2, 3). Ismeretlen okból a *fissula ante fenestram* és a *fossula post fenestram* rendszerint demarkációs határt jelent az otosclerosisos góccok terjeszkedése ellen (2, 3). A stapes szárai közvetlenül soha nem érintettek, hiszen fejlődéstani szempontból különböznek az *oticus capsula* részeként felfogható stapes talptól (1, 2, 4). A kórszöveti jellegzetességek alapján az otosclerosis aktivitása szövettani fokozatokra osztható, melynek alapját a *cellularisatio*, a sejtközötti kollagén mátrix mennyisége és a *pseudovascularis* ürök mérete képezi (3).

Az I. fokozatú (igen aktív) otosclerosist vaskos, eltorzult stapes talp jellemzi, a cementvonalak mintázata szabálytalan, fonatos szerkezetet követ. Az otosclerosisos góc basophil festődésű, hypervascularizált; a tágult *pseudovascularis* üröket számos többmagvú osteoclast, *hypercellularis fibrosus stroma* és szabálytalan alakú osteoblast tölti ki (3). Ezen *pseudovascularis* ürök miatt az otosclerosisos góc úgynevezett „svájci sajt” szerkezetet (*Swiss cheese pattern*) mutat (3). A II. fokozatú (mérsékelten aktív) otosclerosis szövettanilag meglehetősen hasonló, azzal a különbséggel, hogy a tipikus osteoclast-szerű többmagvú sejtek hiányoznak. Az osteoid alapállomány festődése továbbra is basophil; a cementvonalak mozaik szerkezetet mutatnak (3). A III. fokozatú (inaktív) otosclerosist főként eosinophil festődésű, alapvetően fonatos, de helyenként *lamellaris* szerkezetű csontalapállomány jellemzi. Az osteoclastok és az osteoblastok teljesen hiányoznak, a *pseudovascularis* ürök tágassága jelentősen csökkent (3). Az előrehaladott vagy IV. fokozatú (*burn out disease*) otosclerosist teljesen átépült, *lamellaris* csontszerkezet, *hypocellularitas* és *avascularisatio* jellemzi. A kompakt csontállomány élénk eosinophil festődést mutat. Bizonyos esetekben – és ez különösen igaz a cocheláris otosclerosisra – egy nagyobb otosclerosisos gócban mind a négy szövettani fokozat párhuzamosan jelen lehet (3). Felmerül a kérdés, hogy a fenti stádiumok egyazon csontremodellizációs zavar (otosclerosis) létező kategóriái-e, vagy különböző folyamatok egymástól független manifesztációi?

A kanyaróvírus elektronmikroszkópos kimutatásától kezdve, az RT-PCR technikával történő amplifikáción át, számos tudományos eredmény támasztja alá a perzisztens kanyaróvírus fertőzés otosclerosis-

ban betöltött patogenetikai szerepét (5–7). A paramyxovírus fertőzések más csontrendszerbetegségekben, például a Paget-kór (*osteitis deformans*) kialakulásában is szerepet játszhatnak (1, 5–7).

Az otosclerosis korai stádiumában nagy valószínűséggel tumor nekrosis faktor-alfa (TNF-alfa) áramlik ki az otosclerosisos góccokból (8–10). A TNF-alfa bejuthat a perilympa-térbe, méretei alapján diffundálhat az endolymphába is, ahol a külső szőrsejtek elektromotilitási tulajdonságainak megváltoztatásával végső soron szenzorineurális halláscsökkenést okozhat (8, 9). Mivel a TNF-alfa az otosclerosisos góccokban termelődik, az otosclerosis kapcsán kialakuló szenzorineurális halláscsökkenés oka a fenti TNF-alfa kiáramlás lehet.

A TNF-alfa proinflammatorikus cytokin, amely fontos szerepet játszik az *osteolyticus* folyamatokban, csakúgy, mint a csontvelő-eredetű *mononuclearis* sejtek osteoclastokká-, illetve a *stromalis* sejtek osteoblastokká történő differenciálódásában (8–10). A TNF-alfát aktivált monocyták, macrophagok, B- és T-sejtek valamint osteoclastok termelik és mint paracrin mediátor, számos sejtközötti kommunikációs folyamatban vesz részt (8–10). Az aktív otosclerosisban megfigyelték az osteoprotegerin (OPG), vagy másnéven TNFRSF11b (tumor nekrosis faktor-alfa receptor szupercsalád 11b jelű tagja) csökkent kifejeződését is (8). Az OPG gátolja az osteoclast képződést és az osteolysist, ezenkívül apoptosis indukció révén csökkenti az aktivált osteoclastok mennyiségét (8). Az OPG fő funkciója a normális csontanyagcserre fenntartása az osteoclast-osteoblast tengely kiegyensúlyozott működése révén (8, 10). Az OPG úgynevezett „*decoy*” (csalétek) receptorként hat: megakadályozza a RANK (receptor activator of nuclear factor κ B) és a RANK ligand egymáshoz kötődését, gátolva ezzel az osteoclast érést és aktivációt (8, 10).

A TNF-alfa két receptorral rendelkezik (11, 12). Az I-es típusú TNF-alfa receptor (TNFR1, *member of TNF superfamily I*) minden sejtmagyal rendelkező emberi sejtből általánosan kifejeződik és a biológiai hatások lényegesen szélesebb spektrumával rendelkezik, mint a TNFR2 (11). A II-es típusú TNF-alfa receptor (TNFR2, *member of TNF superfamily II*) elsősorban lymphocytákban és antigén prezentáló sejtekben fejeződik ki, de nem elhanyagolható mértékben expresszálják az osteoclastok és a nyugvó *embryonalis* sejtek is (12, 13). A TNFR2 fokozott kifejeződése átmeneti jelenség is lehet, mely megbízható indikátora az akut gyulladási folyamatoknak, hiszen ez a receptor fontos szerepet játszik az immunsejtek toborzásában, az osteoclast aktivációban és különböző gyulladási cytokinek (IL-1, IL-6, TGF- β) terme-

lődésében is (13). A TNF-alfa megkötését követően az I-típusú receptorok homotrimerré álnak össze és aktiválják a SODD doméneket (*silencer of death domains*), amelyek a TRADD doménekhez (*TNFR-associated death domain*) kötődve, három lehetséges szignáltranszdukciós útvonalat nyitnak meg (14, 15). Az első és legfontosabb az NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) rendszer aktivációja (14, 15). Az aktivált NF- κ B heterodimerek számos apoptózis- és gyulladáshoz vezető kódoló gén átírását módosítják, lehetővé téve ezzel a sejtek túlélését és proliferációját (14, 15). A második útvonal a MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) rendszer aktivációját jelenti (14, 15). Ez a szignalizációs folyamat számos nukleáris transzkripciós faktor (JNK, p38-MAPK, ERKs) foszforilációját és aktivációját eredményezi. A JNK (c-jun N-terminal kinases), a p38-MAPK és az ERKs (*extracellular signal-regulated kinases*) olyan transzkripciós faktorok, amelyek a c-fos, a c-jun, a c-myc és az ATF2 (*activating transcription factor 2*) fehérjék expresszióját fokozva, intenzív sejtosztódást és túlélést eredményeznek (14, 15). A harmadik, TNFR1 receptorokkal összefüggő jelátviteli folyamat az úgynevezett „death domain” mediált és kaszpáz-függő apoptózis indukció (16, 17). Az I-es típusú TNF-alfa receptorok TRADD doménjei hozzákötődnek a FADD (*fas-associating death domain containing protein*) fehérjékhez, melyek a CPC-8 (*cysteine protein caspase-8*) kaszpáz komplexek kialakulását mediálják (16, 17). Amikor a CPC-8 eléri a kritikus koncentrációt, *autoproteolysis* szenved, ezzel aktiválódik és kaszpáz-8-as fehérjék felszabadulásához vezet (16, 17). A kaszpáz-8 jelű fehérjék a leg-erősebb apoptózis effektorok közé tartozva, igen gyors programozott sejthalált okoznak (16, 17).

Tanulmányunkban otosclerosis stapes talpak TNF-alfa receptor expressziós mintázatát vizsgáltuk az otosclerosis kórszöveti 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 nyolcvan, stapedectomia során eltávolított, *ankyloiticus* stapes talpat vizsgáltunk (N=80, férfiak=29, nők=51). Az eltávolított stapes mintákat azonnal pufferelt formalin oldatba helyeztük. A betegek átlagéletkora 39,41 év volt (tartomány: 17–71 év). A tanulmányban felhasznált mintákat előzetes szövettani vizsgálatok alapján válogattuk ki egy nagyobb, *ankyloiticus* stapes mintákból álló

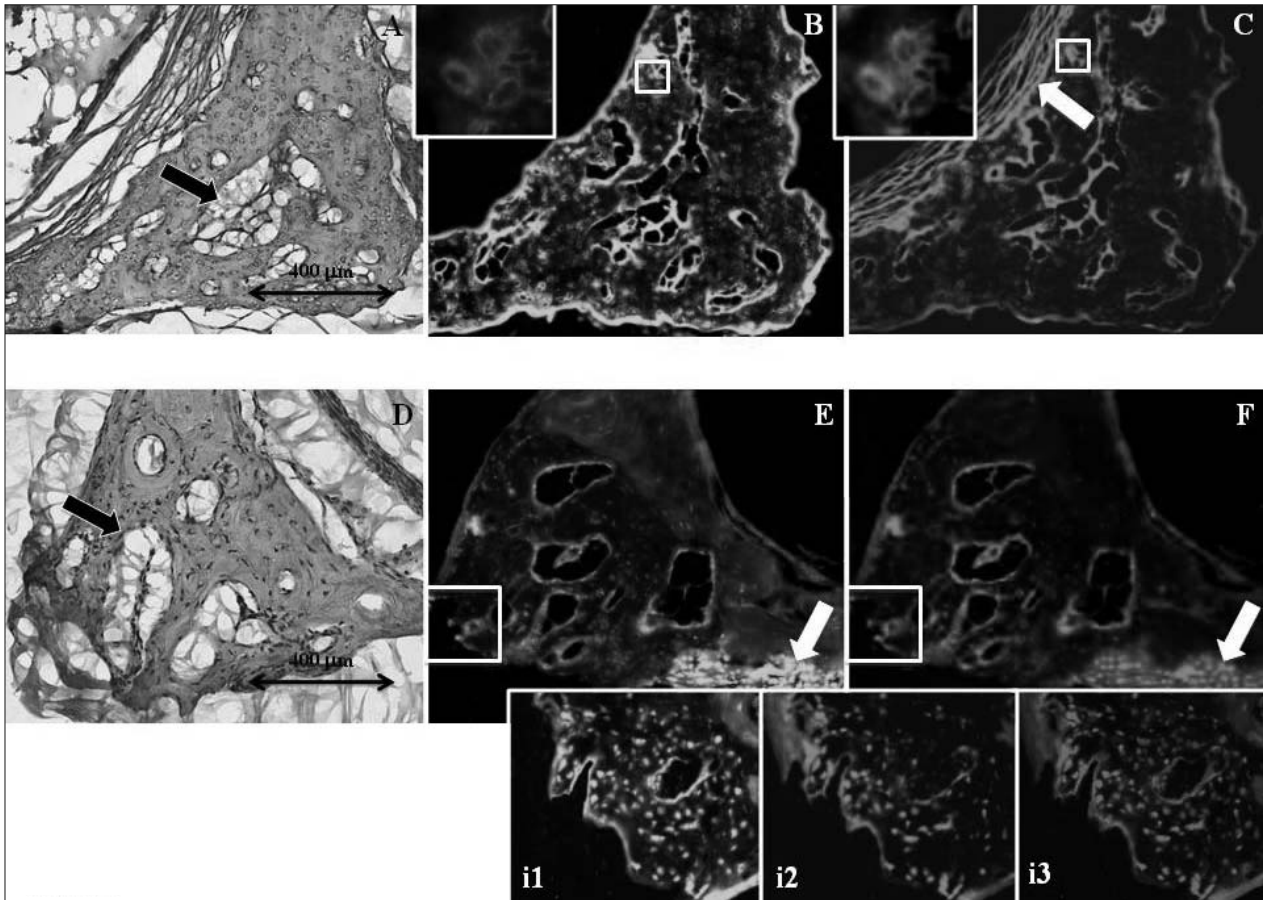
anyagból (N=384) annak érdekében, hogy 40 reprezentatív otosclerosisos és 40 nem-otosclerosisos stapes mintát nyerjünk. A stapes fixáció klinikai diagnózisát az otoscopos-, az audiológiai- és a tympanometriás leletekre alapoztuk. Az 1000 Hz-es frekvencián mért csont-lég köz legalább 30 dB volt. A stapes fixáció a betegek kétharmadában klinikailag kétoldali volt, azonban minden beteg esetén csak egy stapes mintát elemeztünk, mivel a vizsgálati időszakban az esetek nagy többségében csak egy oldali stapedectomia történt. A stapes mintákat 2008. december és 2009. február között gyűjtöttük (POTE Fül-Orr-Gége Klinika, SZOTE Fül-Orr-Gége Klinika, Bajcsy-Zsilinszky Kórház Fül-Orr-Gége Osztály). A tanulmányt az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos Kutatásértékelési Bizottsága az ETT-TUKEB/2008 11354789 nyilvántartási számon engedélyezte.

Szöveti és tumor nekrosis faktor-alfa receptor specifikus immunofluoreszcens vizsgálat

A nyolcvan *ankyloiticus* stapes mintát 10%-os 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 paraformaldehid oldatban újrafixáltuk (24 óra, 20°C). A megszilárdult zselatinból kiképzett szövettani blokkokat krioprotekció céljából 20%-os szacharóz oldatba helyeztük (2 óra, 4°C), majd 10 μ m vastagságú metszetekre szeleteltük (-40°C) (MNT cryomicrotome, Slee, Németország). A metszeteket 0,1 M-os, nátrium azidot is tartalmazó PBS-ben (phosphate-buffered saline) tároltuk 4°C-on. A 10 μ m vastagságú metszetsorozatokról két párhuzamos vizsgálatot végeztünk: 1. hagyományos hematoxylin-eozin festés; és 2. TNF-alfa receptor I-II (TNFR1-II) specifikus immunofluoreszcens vizsgálat. A hematoxylin-eozin festés részleteit korábbi tanulmányainkban már bemutattuk. A metszetek másik részét 0,2 M-os, Protein Block™ oldatot is tartalmazó PBS-ben mostuk (20 perc, 20°C) (1% [w/v], bovine serum albumin [BSA], 0,09% [w/v], nátrium azid, 0,1% [w/v], Tween-20) (BioGenex, CA, Egyesült Államok). A blokkolt metszeteket 0,005 mg/ml koncentrációjú poliklonális kecske anti-humán TNF RI/TNFRSF1A antitest oldattal inkubáltuk (100 μ l, 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 0,02 mg/ml koncentrációjú monoklonális egér hybridoma anti-humán TNF RII/TNFRSF1B antitest oldattal inkubáltuk (100 μ l, 20°C, 24 óra, folyamatos rázás) (R&D Systems,

Egyesült Államok). A második elsődleges antitestet szintén 0,2 M-os PBS oldattal mostuk ki. A mosási lépéseket követően, a metszeteket 0,005 mg/ml koncentrációjú, Northern Lights™ márkájú, szamár 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. A metszeteket végül a második másodlagos antitesttel inkubáltuk: 0,005 mg/ml koncentrációjú, Northern Lights™ márkájú, szamár 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 áteresztő 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 fluorokrómnál 510, míg az NL637-jelűnél 650 nm-es gerjesztési hullámhosszat alkalmaztunk. A digitális fényképeket .jpeg fájlformátumban archiváltuk (Axioskop2 MOT, Axiovision 4.0, Zeiss, Németország).



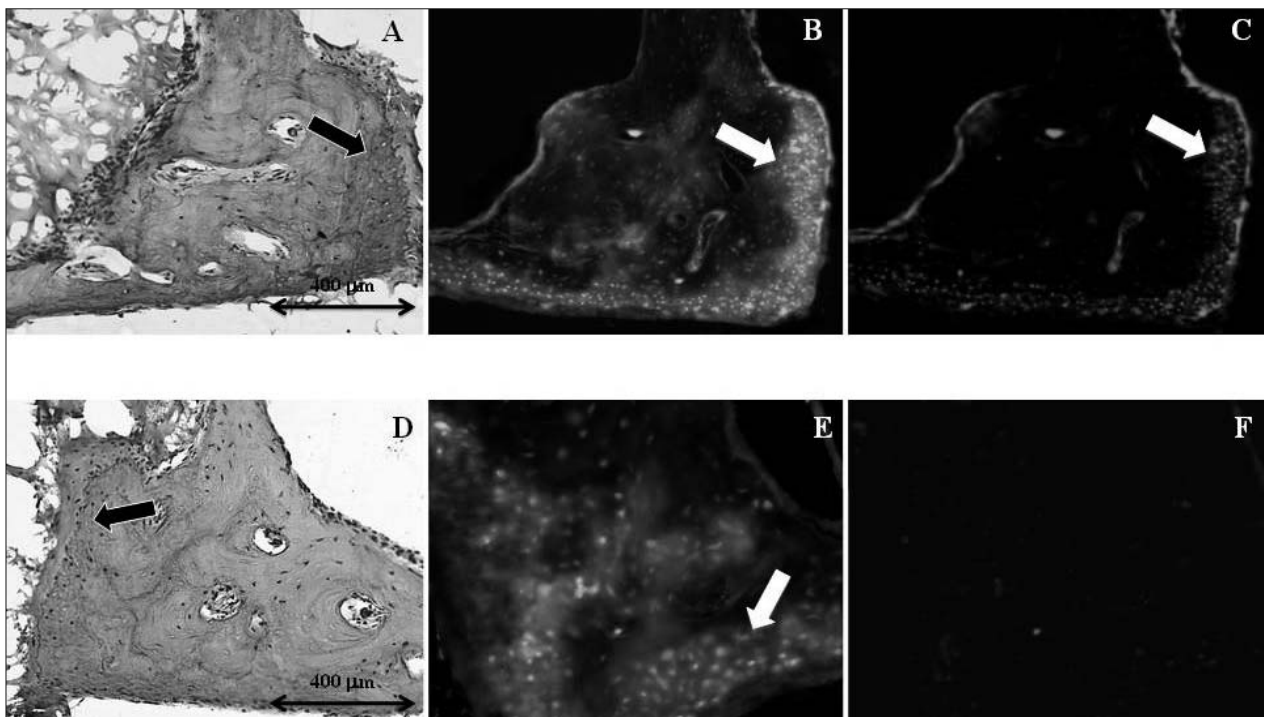
1. ábra: A TNFRI/II expresszió immunfluoreszcens vizsgálata aktív otosclerosis esetén. A: Aktív otosclerosisos (I. fokozat) góc a stapes talp elülső pólusában (H.E.). Hypercellularitás és tágas, pseudoseptumokkal elválasztott, pseudovascularis terek (fekete nyíl) észlelhetők. Az osteoclastok sejtmagjai világosak és felfújtak, amely fokozott kromatin aktivitásra utal. B: A TNFRI expresszió kimutatása az előző metszetben. Az osteoclastok élénk, granularis TNFRI specifikus immunreakciót adnak. A kis képinzert nagyobb nagyítással mutatja be a TNFRI kifejeződést adó osteoclastokat. C: Az otosclerosisos góc sejtjei intenzív TNFRII specifikus immunreakciót mutatnak. A megvastagodott középfül nyálkahártya szintén élénk TNFRII specifikus reakciót ad (fehér nyíl). A kis képinzert nagyobb nagyítással mutatja be a TNFRII kifejeződést adó osteoclastokat. D: Mérsékelt aktivitású (II. fokozat) otosclerosisos góc a stapes talp hátsó pólusában (H.E.). A pseudovascularis tereket fekete nyíl mutatja. Az osteoid alapállomány továbbra is sejtűs, azonban a cementvonalak szabálytalan fonatos és örvénylő szerkezetet követnek. E: A TNFRI expresszió kimutatása az előző metszetben. Az otosclerosis léziót alkotó sejtek erős, annularis immunreakciót mutatnak. A stapes talp vestibularis felszínének hyalinporc rétege élénk TNFRI kifejeződéssel jellemezhető (fehér nyíl.). F: A TNFRII kifejeződés meglehetősen hasonló mintázatot mutat. A vestibularis felszín hyalinporc rétege erős TNFRII specifikus immunreakciót ad (fehér nyíl). i1: TNFRI kifejező osteoclastok nagyobb nagyítással. i2: TNFRII kifejező osteoclastok nagyobb nagyítással. i3: A két előző kép fúziós felvétele. Az aktív otosclerosisos góc osteoclastjai mindkét TNF-alfa receptort kifejezik (narancssárga színfúzió), azonban a perivascularis területet csak az I-es típusú TNF-alfa receptor expressziója jellemzi (zöld).

Eredmények

A vizsgált stapes talpkból két párhuzamosan vizsgált metszetsorozatot készítettünk, melyeket hagyományos hematoxylin-eozin festésnek és tumor nekrozis faktor-alfa receptor I és II specifikus immunfluoreszcens vizsgálatnak vetettünk alá. Kórszövetetani vizsgálattal alátámasztott otosclerosis 40 ankyloticus stapes talpban diagnosztizáltunk. Ezen betegek között az otosclerosisos góc 24 esetben volt aktív (I. és II. fokozat), és 16 esetben inaktív (III. és IV. fokozat) (1. táblázat, 1–2. ábra). Hangsúlyozzuk, hogy a részlegesen eltávolított stapes talpakat kizártuk a tanulmányból, hiszen az ovális ablakban maradt elülső, illetve hátsó stapes talp részletek tartalmazhatták a valódi csontos fixációt okozó elváltozást. A negyven nem-otosclerosisos stapes talpban annuláris kalcifikációt (eosinophil extracelluláris mátrix, csökkent *cellularitas* és *hypovascularisatio*; N=27) és globuláris fibrózist (mono- ill. bipoláris csontreszorpció a stapes talp elülső pólusában; N=13) találtunk (1. táblázat, 3. ábra).

A stapes talpak *vestibularis* felszínén lévő hyalin-

porcréteg chondrocytái minden esetben pozitív reakciót adtak a TNFR1/II receptor komplex antigénjeire (1. táblázat, 1–3. ábra). Ez az eredmény nem meglepő, hiszen ezek a sejtek *embryonalis* maradványokként foghatók fel, amelyek a a stapedialis otosclerosis lézió-formáló sejteinek kiindulási pontjaként szerepelhetnek (1–2. ábra). Ezzel szemben, a nem-otosclerosisos stapes fixációk esetén, a csontléziók sejteinek (macrophagok, osteoclastok) felszínén nem észleltünk szignifikáns TNFR1/II receptor expressziót (3. ábra). Az otosclerosisos gócok osteoclastjai élénk TNF-alfa receptor I és II expressziót mutatnak, amely az otosclerosisos gócokban zajló aktív gyulladásos csontátépülésre utal (1–2. ábra). Ezekben az esetekben, a két TNF-alfa receptor expressziós szintje és mintázata statisztikailag is szignifikáns összefüggést mutatott az otosclerosis szövettani aktivitásával (χ^2 -próba, $p < 0,001$) (1. táblázat). Az aktív (I–II fokozat) otosclerosisot számos, többmagvú osteoclasttal kitöltött *pseudovascularis* űrök jellemezték, melyet erős *granularis* TNFR1 és TNFR2 specifikus immunreakció kísért (1. ábra). Az aktív stádiumokkal szemben, az előrehaladott otosclerosisot (III–IV

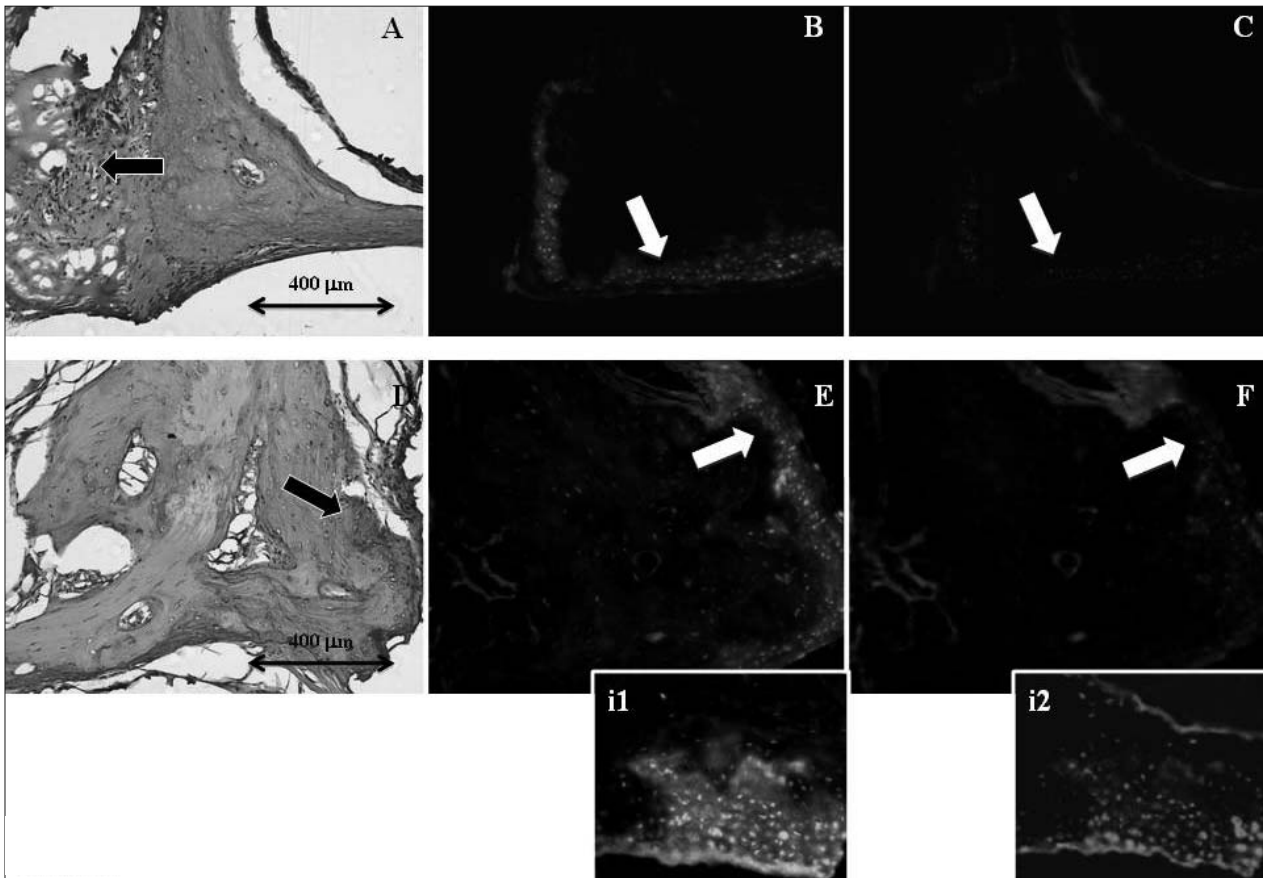


2. ábra: A TNFR1/II expresszió immunfluoreszcens vizsgálata inaktív (kiégett) otosclerosis esetén. A: Inaktív (III. fokozat) otosclerosisos góc a stapes talp elülső pólusában (H.E.). Az otosclerosisos gócot hypocellularitas, hypovascularisatio, jelzett basophilias és a cementvonalak fonatos szerkezete jellemzi. A hyalinporc réteg deformált (fekete nyíl). B: Az előző metszetben gyenge, annularis TNFR1 expresszió észlelhető. A vestibularis felszín hyalinporc rétege továbbra is erős TNFR1 kifejeződést mutat (fehér nyíl). C: A léziót alkotó sejtek a hyalinporc réteggel (fehér nyíl) ellentétben, elhanyagolható TNFR2 specifikus immunreakciót adnak. D: Előrehaladott (IV. fokozat) otosclerosis. Az osteoid alapállomány sejtmentes, avascularis és jelzett eosinophilias mutat. A hyalinporc réteget fekete nyíl mutatja (H.E.). E: Az előző metszetben gyenge, annularis megjelenésű TNFR1 expresszió észlelhető. A vestibularis felszín hyalinporc rétege továbbra is erős TNFR1 specifikus immunreakciót ad (fehér nyíl). F: A II-es típusú TNF-alfa receptor specifikus immunreakció gyakorlatilag negatív.

A TNF-alfa receptorok expressziója otosclerosisos és a nem-otosclerosisos stapes talpakban

Kórszövetten (H.E.) (N=80)	TNF α -RI ¹	TNF α -RII
Otosclerosisos stapes fixáció (N=40)		
Aktív otosclerosis (I-II fokozat) (N=24)	++(+)	+++
Inaktív otosclerosis (III-IV fokozat) (N=16)	+(+)	-
Nem-otosclerosisos stapes fixáció (N=40)		
Annuláris kalcifikáció (N=27)	-	-
Globuláris fibrózis (N=13)	-	-
A stapes talpak vestibularis felszínének hyalinporc rétege (N=80)	++	++

¹Tumor nekrosis faktor-alfa receptor (I és II) specifikus immunreakció; - negatív; + gyenge perivascularis reakció; ++ erős annularis reakció; +++ durva granularis, szinte összefolyó reakció



3. ábra: A TNFRI/II expresszió immunfluoreszcens vizsgálata nem-otosclerosisos stapes fixációk esetén. A: Globuláris fibrózis a stapes talp elülső pólusában (H.E.). A stapes talp normális megjelenésű, a fibroticus nodulest fekete nyíl mutatja. B: Az osteoid alapállományban nem észlelhető TNFRI kifejeződést mutató sejt, azonban a hyalinporc réteg erős annularis immunreakciót ad (fehér nyíl). C: A hyalinporc réteg chondrocytáival szemben (fehér nyíl), az osteocyták nem fejezik ki a II-es típusú TNF-alfa receptort. D: Annuláris kalcifikáció (H.E.). A stapes talp deformált, acelluláris, a cementvonalak lamelláris mintázatot követnek. A hyalinporc réteg feltöredezett (fekete nyíl). E: Az előző metszetben nem észlelhető TNFRI specifikus immunreakció. A hyalinporc réteg ebben az esetben is erős annularis immunreakciót mutat (i1, nagy nagyítás). F: A hyalinporccal szemben (i2), az osteocyták és az osteoblastok nem fejezik ki a II-es típusú TNF-alfa receptort.

fokozat) néhány, elszórta jelentkező osteoclast és gyenge, *annularis* TNFR1 specifikus immunreakció, valamint hiányzó TNFR2 expresszió jellemezte (2. ábra).

Megbeszélés

Megfigyeléseink további információval szolgálnak az otosclerosis gyulladással pathogenezisét és a különböző kórszövettani stádiumok átmeneteinek molekuláris hátterét illetően. Az otosclerosis korai stádiumaiban észlelhető, fokozott I-es és II-es típusú TNF-alfa receptor expresszió a gyulladással *osteolyticus* kaszkád aktiválódását eredményezi (4. ábra). Számos gyulladással citokin (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 (8, 9). A felfokozott csontátépülés végpontja az osteoid alapállomány sejtjeinek eltűnését eredményező apoptózis (kiégett otosclerosis) (1, 3, 16, 17). Visszatérve korábbi és jelenlegi eredményeinkhez, hangsúlyozzuk, hogy az otosclerosis és a nem-otosclerosis stapes fixációk etio-pathogenezise teljes mértékben különbözik (8, 9).

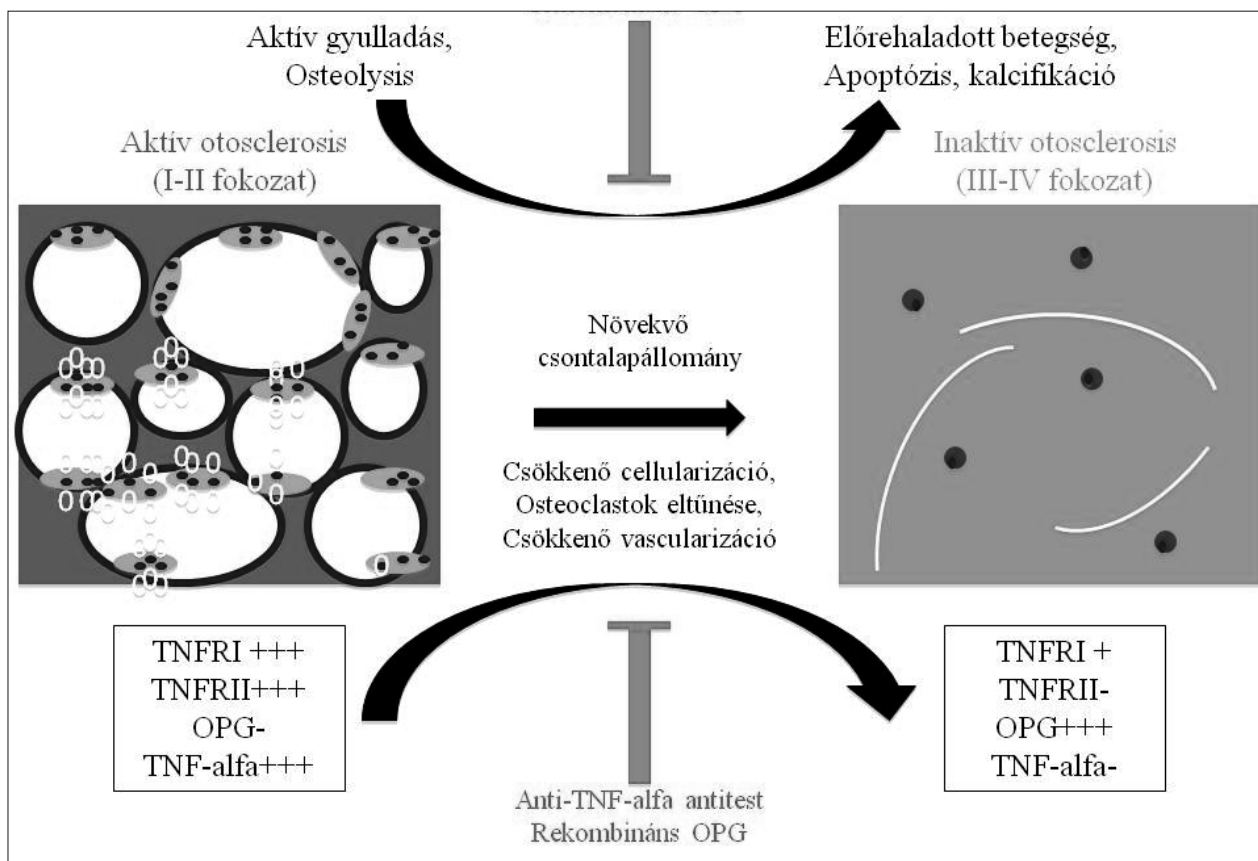
Az otosclerosis csontátépülési zavar organotropizmust mutat az *oticus capsula* iránt. Az otosclerosis góccok kizárólag a temporális csontban jelennek meg, a belfül csontos részletein kívül, sehol nem észlelhetőek (1, 2). Ennek valószínűleg fejlődéstani okai lehetnek (1, 2). Az *oticus capsula* és a stapes talp enchondrális típusú csontosodása a születést követő egy évben fejeződik be (1, 2). A csontosodás befejeztével, az *oticus capsulában*, normális körülmények között nem észlelhető a csontrendszerre egyébként jellemző, folyamatos csontátépülés. Az *oticus capsula* szövettanilag három rétegből épül fel: 1. a perilympa térhez közel eső *endostealis* réteg; 2. *globuli interossei*, mely *embryonalis* porcmaradványnak tekinthető; 3. *periostealis* réteg (2). Az otosclerosis kialakulása valószínűleg a középső rétegben kezdődik el. Az *oticus capsulával* szemben, a stapes talp csak két szöveti rétegből épül fel, mivel az *endostealis* réteg hiányzik (2). A stapes talp *vestibularis* felszínét borító hyalinporc réteg az *oticus capsula* középső rétegének felel meg, és mint ilyen, *embryonalis* maradványnak tekinthető (2).

Az otosclerosis góccok osteoclastjait differenciálatlan, *embryonalis* fenotípus jellemzi (CD51/61 antigén expresszió) szemben a nem-otosclerosis stapes fixációkkal (18). A szokatlan CD51/61 antigén expressziót mutató osteoclastok az *oticus capsula* kö-

zépső rétegének nyugvó, *embryonalis-típusú* sejtjeiből származhatnak (18). Ez a celluláris transzformáció érthetővé teszi a globuli interossei, otosclerosis góccokban tapasztalható hiányát (1–3, 18). A *globuli interosseit* képző, chondrocyta-szerű sejtek igen alacsony metabolikus aktivitással rendelkeznek és számottevő morfológiai változások nélkül, egész életen át perzisztálnak (1). Korábbi feltételezéseinknek megfelelően, ezeket a sejteket pluripotens *embryonalis* maradványokként foghatjuk fel, amelyek a kanyaróvírus ellen adott gyulladással válasz során reaktiválódva osteoclastokká alakulhatnak át (18). Jelen megfigyeléseink az otosclerosis különböző stádiumaiban és a stapes talp hyalinporc rétegében észlelhető TNF-alfa receptor kifejeződéssel kapcsolatban, alátámaszthatják a fenti elméletet (8). Azonban a jövőben további *in vitro* vizsgálatok és szövettenyésztés szükséges az elmélet bizonyításához.

Napjainkban a sebészeti megoldások (stapedectomy, stapedotomy) jelentik az otosclerosis halláscsökkenés elődleges kezelését. Azonban figyelembe véve a betegség autoimmun-gyulladással jellegzetességeit és a csontanyagcsere érintettségét, a gyógyszeres kezelés, amely magába foglalja az osteoporosis-ellenes-, immunszuppresszív- és gyulladással-ellenes szereket, hatásos lehet az otosclerosis korai, aktív stádiumaiban (19–22).

Jelen megfigyeléseink alátámasztják a TNF-alfa és receptorai központi szerepét az otosclerosisban észlelhető gyulladással csontátépülés pathogenezisében. Mivel az otosclerosis csontban proinflammatorikus citokinek – elsősorban TNF-alfa – termelődnek, biológiai szereket (anti-TNF-alfa antitest) helyi vagy szisztémás alkalmazása szóba jöhet az otosclerosis aktív stádiumait kísérő szenzoriális halláscsökkenés kezelésében (23,24) (4. ábra). Jelenleg egy tanulmány tárgyalja az *infliximab* (anti-TNF-alfa antitest) intratympanalis perfúziójának autoimmun szenzoriális halláscsökkenésben (*autoimmune inner ear disease*, AIED) észlelhető klinikai hatékonyságát (25). Ebben a tanulmányban 9 olyan AIED-ben szenvedő beteg szerepel, akiket vagy nem kezeltek kortikoszteroiddal, vagy kezeltek ugyan, de a szteroid megvonás után relapsus jelentkezett (25). Az *infliximab* kezelés 4 héten keresztül, heti egy alkalommal történt (25). A halláseredmények minden betegnél javultak és a TNF-blokkoló elhagyása után szteroid kezelésre már nem volt szükség. Az *infliximab* kezelés után, a halláslelet kilencből 7 beteg esetén teljes remissziót mutatott (25). Állatkísérletes tanulmányok alapján, egy rövid távú rekombináns OPG (OPG-Fc) kezelés – anti-osteolyticus hatásai révén –, szintén alkalmas lehet az otosclerosis korai stádiumainak ke-



4. ábra: Az otosclerosis egyes kórszövettani stádiumai közötti átmenetet ábrázoló sematikus diagramm. OPG: osteoprotegerin, TNF-alfa: tumor nekrozis faktor-alfa, TNFRI: tumor nekrozis faktor-alfa receptor I, TNFRII: tumor nekrozis faktor-alfa receptor II.

zelésére (26, 27). Összességében a RANK-tengely által mediált osteolysis gátlása, újból normális csontremodellizációt eredményezhet az otosclerosis által érintett csontban (26, 27) (4. ábra). Visszatérve a csontanyagcsere szabályozásához, a biszfoszfonátok a BMP (*bone morphogenetic protein*) szintézis igen erős inhibitorai. Néhány klinikai előtanulmány már bizonyította a biszfoszfonát kezelés hatékonyságát az otosclerosis korai stádiumaiban (28, 29). Brookler és mtsai (29) igazolták az etidronát hatásosságát az otosclerosist kísérő szenzorineurális halláscsökkenés kezelésében. Az otosclerosis pathogenezisével kapcsolatos jelen tudásunk szerint, az anti-TNF-alfa szerek rendelkezhetnek a lespecifikusabb támadásponttal és a legnagyobb hatékonysággal az otosclerosissal csontátépülési zavar gátlásában.

Összefoglalva: az otosclerosis az emberi *oticus capsula* összetett csontremodellizációs zavara, melynek pontos etiopathogenezise továbbra is tisztázatlan. A betegségnek közvetve genetikai háttere is lehet (30). Ezen kívül a perzisztens kanyaróvírusfertőzés, autoimmun-gyulladásos folyamatok, hormonális és metabolikus tényezők ugyancsak szerepet játszhatnak az otosclerosis pathogenezisében (1, 5). 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 otosclerosist kísérő szenzorineurális halláscsökkenés legmegfelelőbb gyógyszeres kezelését.

Köszönetnyilvánítás

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

Irodalomjegyzék

1. Chole RA, McKenna MJ. Pathophysiology of otosclerosis. *Otol Neurotol.* 22(2), 249-257, 2001.
2. Friedmann I. Pathology of the ear. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 245-281, 1974.
3. Iyer V, Gristwood H. Histopathology of the stapes in otosclerosis. *Pathol.* 16, 30-38, 1984.
4. Cureoglu S, Schachern PA, Ferlito A, Rinaldo A, Tsiprun V, Paparella MM. Otosclerosis: etiopathogenesis and histopathology. *Am J Otolaryngol.* 27(5), 334-340, 2006.

5. 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.
6. 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.
7. Karosi T, Kónya J, Szabó LZ, Sziklai I. Measles virus prevalence in otosclerotic stapes footplate samples. *Otol Neurotol*. **25**(4), 451-456, 2004.
8. Karosi T, Jókay I, Kónya J, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J, Szalmás A, Sziklai I. Detection of osteoprotegerin and TNF-alpha mRNA in ankylosed stapes footplates in connection with measles virus positivity. *Laryngoscope*. **116**(8), 1427-1433, 2006.
9. 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.
10. Mannel DN, Echtenacher B. TNF in the inflammatory response. *Chem Immunol*. **74**, 141-161, 2000.
11. Grell M, Wajant H, Zimmermann G and Scheurich P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**, 570-575, 1998.
12. Bazan JF. Emerging families of cytokines and receptors. *Curr Biol*. **3**, 603-606, 1993.
13. Locksley RM, Killeen N and Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. **104**, 487-501, 2001.
14. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. **10**(1), 45-65, 2003.
15. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. **296**(5573), 1634-1635, 2002.
16. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*. **53**, 45-53, 1988.
17. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*. **254**, 439-459, 1998.
18. Karosi T, Jókay I, Kónya J, Petkó M, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J, Sziklai I. Activated osteoclasts with CD51/61 expression in otosclerosis. *Laryngoscope*. **116**, 1478-1484, 2006.
19. Taylor PC. Anti-tumor necrosis factor therapies. *Curr Opin Rheumatol*. **13**, 164-169, 2001.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Sziklai I. Human otosclerotic bone-derived peptide decreases the gain of the electromotility in isolated outer hair cells. *Hear Res*. **95**, 100-107, 1996.
24. Wang X, Truong T, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Blockage of immune-mediated inner ear damage by etanercept. *Otol Neurotol*. **24**(1), 52-57, 2003.
25. Van Wijk F, Staecker H, Keithley E, Lefebvre PP. Local perfusion of the tumor necrosis factor alpha blocker infliximab to inner ear improves autoimmune neurosensory hearing loss. *Audiol Neurootol*. **11**, 357-365, 2006.
26. Zehnder AF, Kristiansen AG, Adams JC, Kujawa SG, Merchant SN, McKenna MJ. Osteoprotegerin knockout mice demonstrate abnormal remodeling of the otic capsule and progressive hearing loss. *Laryngoscope*. **116**, 201-206, 2006.
27. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodelling. *Cytokine Growth Factor Rev*. **15**(6), 457-475, 2006.
28. Brookler K. Medical treatment of otosclerosis: rationale for use of bisphosphonates. *Int Tinnitus J*. **14**, 92-96, 2008.
29. Brookler KH, Tanyeri H. Etidronate for the the neurotologic symptoms of otosclerosis: preliminary study. *Ear Nose Throat J*. **76**, 371-376, 379-381, 1997.
30. Van Den Bogaert K, Govaerts PJ, De Leenheer EM, Schatteman I, Verstreken M, Chen W, Declau F, Cremers CW, Van De Heyning PH, Offeciers FE, Somers T, Smith RJ, Van Camp G. Otosclerosis: a genetically heterogeneous disease involving at least three different genes. *Bone*. **30**, 624-630, 2002.

Zusammenfassung: