

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

A stapes fixációk etiopathogenezisének vizsgálata

Csomor Péter

Témavezető:
Dr. Karosi Tamás



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen 2012

Stapes fixációk etiopathogenezisének vizsgálata

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében

klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Csomor Péter okleveles biológus/biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori
iskolája
(Klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Dr. Karosi Tamás, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Szondy Zsuzsanna, az MTA
doktora
Dr. Takács István, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2012.október 26. 11:00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Gerlinger Imre, PhD
Dr. Szántó Sándor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Szondy Zsuzsanna, az MTA
doktora
Dr. Takács István, PhD
Prof. Dr. Gerlinger Imre, PhD
Dr. Szántó Sándor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2012. október 26. 13:00

ELMÉLETI HÁTTÉR ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A stapes fixációk etiopathogenetikai háttere eltérő lehet, ezek közül is kiemelten fontos az otosclerosis stapes fixációk etiopathogenezisének tisztázása, amely mind a mai napig élénk viták tárgyát képezi. Az otosclerosis a belső fül csontos tokjának (capsula otica) csontremodellációs zavara, amelynek következtében a stapes talp rögzülése (stapes ankylosis) és a cochleában zajló endostealis osteolysis eredményeként progresszív vezetékes- és/vagy szenzorineurális halláscsökkenés alakul ki.

A patológias csontremodellációs folyamat az otosclerosis góccokon belül fokozott osteoclast tevékenységgel és intenzív osteolysissal jellemezhető. Az otosclerosis góccok kizárólag a capsula oticában keletkeznek: a stapes talpban, a pericochleáris valamint a perilabyrinthae régiókban. Mivel az otosclerosis által érintett és átépült stapes talp fizikai és mechanikai tulajdonságai megváltoznak, elsődlegesen vezetékes halláscsökkenés alakul ki. A kaukázusi fehérek között a klinikai otosclerosis (valójában ismeretlen eredetű stapes fixáció) prevalenciája általánosan 0,3-0,4%-ra tehető, míg a vezetékes halláscsökkenésben szenvedők között eléri a 9-12%-ot is. Korábbi tudományos eredmények alapján az otosclerosis fő kóroki tényezője a capsula otica perzisztáló kanyaróvírus fertőzése lehet. A kanyaróvírus eredetű antigének folyamatos jelenléte feltehetőleg serkenti a lokális celluláris immunválaszt, amely következményes gyulladásos csontátépülést, és ezzel párhuzamosan kialakuló szenzorineurális halláscsökkenést

eredményez. Korábbi tanulmányok részletesen elemezték a kanyaróvírus otosclerosisban betöltött rendhagyó pathogén szerepét, és szignifikáns összefüggést találtak. Az otosclerosisos stapes talpakban több kutatócsoport is azonosította a kanyaróvírus genomot RT-PCR technika segítségével. A paramyxovírus-szerű részecskéket elektronmikroszkópia során is kimutatták az otosclerosisos gócok osteoclastjaiban és osteoblastjaiban is. A kanyaróvírus lévén a Paramyxovírus család tagja, három, a víruscsaládra jellemző útvonalon képes bejutni az emberi sejtekbe. A legfontosabb és legnagyobb hatásfokkal bíró fertőzési útvonal a SLAM (signalling lymphocyte activating protein, CD150) receptorokhoz kötött; a CD46 receptoron (MCP, membrane cofactor protein) keresztül bekövetkező fertőzés kisebb hatásfokkal bír ugyan, de minden emberi sejt fertőzésére alkalmas, tehát általánosan elterjedt. A vírusfertőzés újabb útjait is feltárták olyan sejtvonalakon, amelyek nem fejeztek ki egyetlen eddig ismert kanyaróvírus receptort sem. Ezek az infekciós utak igen kis hatásfokúak, nem járnak jelentős vírusreplikációval és szinte azonnali sejtszéteséshez vezetnek. Az eddig még ismeretlen kanyaróvírus receptor-szerű molekulát Receptor X-nek nevezték el. Immunhisztokémiai tanulmányok szerint a SLAM-típusú fehérjék nagyon alacsony expressziós szintet mutatnak az emberi capsula oticában, szemben a CD46-típusú kanyaróvírus receptorral, amely nagy mennyiségben fejeződik ki. Ezen eredmények alapján azt feltételezzük, hogy a kanyaróvírus bejutása a capsula otica sejtjeibe alapvetően a CD46 receptoron keresztül valósul meg. A CD46 fehérje 14 ismert variánsal

(izoformával) rendelkezik, amelyek egyetlen CD46 génről átíródott mRNS alternatív „splicing“-ja során változó mennyiségben és mintázatban fejeződnek ki. A különböző CD46 izoformák minden sejtmaggal rendelkező emberi sejt felszínén kifejeződnek, de expressziós szintjük és mintázatuk inter- és intraindividuálisan is, valamint szövettípustól függően is jelentősen különbözhet. Ennek ellenére az egyes izoformák koexpressziójához eddig még nem tudtak specifikus funkciókat hozzárendelni.

Az I. fokozatú (igen aktív) otosclerosist vaskos eltorzult stapes talp jellemzi, a cementvonalak mintázata szabálytalan, fonatos szerkezetet követ. Az otosclerosis góc basophil festődésű, hypervascularizált; a tágult pseudovasculáris ürököt számos többmagvú osteoclast, hypercelluláris fibrosus stroma és szabálytalan alakú osteoblast tölti ki. Ezen pseudovasculáris ürök miatt az egész otosclerosis góc úgynevezett „svájci sajt“ szerkezetet (Swiss cheese pattern) mutat. A II. fokozatú (mérsékeltén 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. A III. fokozatú (inaktív) otosclerosist főként eosinophil festődésű alapvetően fonatos, de helyenként lamelláris szerkezetű csontalapállomány jellemzi. Az osteoclastok és az osteoblastok teljesen hiányoznak, a pseudovasculáris ürök tágassága jelentősen csökken. Az előrehaladott, vagy IV. fokozatú (burn out disease) otosclerosist teljesen átépült, lamelláris csontszerkezet jellemzi. A kompakt

csontállomány élénk eosinophil festődést mutat. Bizonyos esetekben –és ez különösen igaz a cochleáris otosclerosisra – egy nagyobb otosclerosisos gócban mind a négy szövettani fokozat párhuzamosan jelen lehet.

Az otosclerosis korai stádiumában nagy valószínűséggel tumor nekrózis faktor-alfa (TNF- α) áramlik ki az otosclerosisos gócokból. A TNF- α bejuthat a perilympa térbe, méretei alapján diffundálhat az endolymphába is, ahol a külső szőrsejtek elektromotilitási tulajdonságainak megváltoztatásával végső soron szenzineurális halláscsökkenést okozhat. Mivel a TNF- α az otosclerosisos gócokban termelődik, az otosclerosis kapcsán kialakuló szenzineurális halláscsökkenés oka a fenti TNF- α kiáramlás lehet. A TNF- α proinflammatorikus cytokin, amely fontos szerepet játszik az osteolyticus folyamatokban, csakúgy, mint a csontvelő-eredetű mononucleáris sejtek osteoclastokká-, illetve a stromális sejtek osteoblastokká történő differenciálódásában. A TNF- α -t aktivált monocyták, macrophagok, B- és T-sejtek valamint osteoclastok termelik és mint paracrin mediátor számos sejtközötti kommunikációs folyamatban vesz részt. Az aktív otosclerosisban megfigyelték az osteoprotegerin (OPG), vagy másnéven TNFRSF11b (tumor nekrózis faktor-alfa szupercsalád 11b jelű tagja) csökkent kifejeződését is. Az OPG gátolja az osteoclast képződést és az osteolysist, ezenkívül az apoptózis indukció révén csökkenti az aktivált osteoclastok mennyiségét. Az OPG fő funkciója a normális csontanyagcsere fenntartása az osteoclast-osteoblast tengely kiegyensúlyozott működése révén. Az OPG úgynevezett „decoy“

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. A TNF- α két receptorral rendelkezik. Az I-es típusú (TNFR1, member of TNF superfamily I) minden sejtmaggal rendelkező emberi sejtben általánosan kifejeződik és a biológiai hatások lényegesen szélesebb spektrumával rendelkezik, mint a TNFR2. A II-es típusú TNF- α 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 embrionális sejtek is. A TNFR2 fokozott kifejeződése átmeneti jelenség is lehet, mely megbízható indikátora az akut gyulladásos folyamatoknak, hiszen ez a receptor fontos szerepet játszik az immunsejtek toborzásában, az osteoclast aktivációban és különböző gyulladásos citokinek (IL-1, IL-6, TGF- β) termelődésében is. A TNF- α megkötését követően az I-es típusú receptorok homotrimerekké állnak össze és aktiválják a SODD doméneket (silencer of death domain), amelyek a TRADD doménekhez (TNFR-associated death domain) kötődve, három lehetséges szignáltranszdukciós útvonalat nyitnak meg. Az első és legfontosabb az NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) rendszer aktivációja. Az aktivált NF- κ B heterodimerek számos apoptózis- és gyulladásos fehérjét kódoló gén átírását módosítják, lehetővé téve ezzel a sejtek túlélését és proliferációját. A második útvonal a MAPK (mitogen-activated protein kinases) rendszer aktivációját jelenti. Ez a szignalizációs

folyamat számos transzkripció (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 transzkripció faktorok, amelyek a c-fos, c-jun, a c-myc és az ATF2 (activating transcription factor 2) fehérjék expresszióját fokozva intenzív sejtosztódást és túlélést eredményeznek. A haramdik, TNFRI receptorokkal összefüggő jelátviteli folyamat az úgynevezett „death domain” mediált kaszpáz-függő apoptosis indukció. Az I-es típusú TNF- α receptorok TRADD doménjei hozzákötődnek a FADD (fas-associated death domain containing protein) fehérjékhez, melyek a CPC-8 (cystein protein caspase-8) kaszpáz komplexek kialakulását mediálják. Amikor a CPC-8 eléri a kritikus koncentrációt, autoproteolysist szenved, ezzel aktiválódik és kaszpáz-8 fehérjék szabadulnak fel. A kaszpáz-8 jelű fehérjék a legerősebb apoptózis effektorok közé tartozva, igen gyors programozott sejthalált okoznak.

Az apoptózis a sejthalál egy speciális formája, amely a nekrozistól funkcionálisan és morfológiailag is különbözik. Általánosságban, az apoptózist a nucleáris chromatin kondenzációja, a cytoplazma zsugorodása, az endoplasmaticus reticulum tágulata, és a sejtmembrán hólyagszerű zárványai jellemzik. Az apoptózis kétféle útvonalon mehet végbe: 1; A Bcl-2 által gátolható, vagy másnéven intrinsic úton, melyet intracelluláris károsodások, celluláris stressz, fejlődési rendellenességek és toxicus tényezők indítanak el; és 2; a kaszpáz-8/10 függő- vagy extrinsic úton, melyet a „death receptorok” aktiválódása a TNF-szupercsalád ligandjainak (pl. TNF-

α) receptorkötődése révén következik be. A TNF-szupercsaládhoz tartozó ligandok felszabadulása az immunrendszer konkrét cytotoxicus válaszaihoz köthető, melyek bizonyos vírusfertőzések, illetve a $CD8^+$ T-lymphocyták (CTL, cytotoxic T-lymphocyte) és a természetes ölősejtek (NK, natural killer cells) érése és aktiválódása során alakulnak ki. Eddigi megfigyeléseink alapján azt feltételezzük, hogy az otosclerosisban tapasztalható gyulladásos csontátépülési zavart az apoptózist gátló (hCIAP1/2) és serkentő (Granzyme- β) fehérjék fiziológiás egyensúlyának TNF- α 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- α receptor asszociált fakorok (TRAF1, TRAF2) megkötése és az ICE-szerű (interleukin-1 converting enzyme) proteázok degradálása révén gátolják az apoptózist. A hCIAP1 a menadion által indukált apoptózist is gátolja. Ennek említése azért fontos, mert a menadion (és még számos más toxicus szer, pl cisplatin) hatására szabadgyökök keletkeznek, melyek központi szerepet töltenek be bizonyos szenzorineurális halláscsökkenések pathogenezisében. A Granzyme- β -t (Granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine serine esterase 1) $CD8^+$ cytotoxicus T-sejtek és NK sejtek teremlik. Jelenleg azt feltételezik, hogy a fenti sejtek azáltal védik meg a szervezet egészséges sejtjeit, hogy a különböző, nem-saját felszíni antigéneket kifejező, általában intracelluláris patogénnel fertőzött sejtekben apoptózis indukálnak.

A Granzyme- β központi szerepet tölt be a célsejtek gyors apoptózis indukciójában.

Áttekintve jelenlegi ismereteinket az otosclerosis háttéréről beleértve a csontremodellációs zavarokat, perzisztáló kanyaróvírus fertőzést, autoimmunitást, gyulladásos, genetikai, hormonális és környezeti tényezőket az alábbi főbb célokat tűztük ki a kísérletes munkához:

1. A kanyaróvírus jelenlétének kimutatását az otosclerosis szövetekből, valamint ehhez kapcsolatosan a vírus receptoraként is funkcionáló CD46 molekula egyedi expressziós mintázatának feltérképezését az oticus capsulában.
2. A TNF- α receptorok (TNFRI/II) egyedi expressziós mintázatának vizsgálatát az emberi oticus capsulában
3. Az apoptózist indukáló (Granzyme- β) és gátló (hCIAP1/2) fehérjék kifejeződésének vizsgálatát, amelyek fontos szerepet játszanak a felborult apoptózis/sejt túlélés egyensúly szabályozásában.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A korábban megfogalmazott célkitűzésekkel összhangban három kísérletsorozatot indítottunk, amelyekben stapedectomy során eltávolított stapes mintákat használtunk fel:

1. CD46 polimorfizmus vizsgálata: n=51; férfiak n=17; nők n=34 (otosclerosis n=21; nem-otosclerosis n=30). A műtéti úton (stapedectomy) eltávolított stapes talpakat szövettani és molekuláris biológiai módszerekkel egyaránt vizsgáltuk. Mintáinkból kivontuk a nukleinsavakat. Elvégeztük a kanyaróvírus genom kimutatását egy nukleoprotein RNS-specifikus reverz transzkripció polimeráz láncreakcióval (RT-PCR). Az alternatív splicing-on átesett CD46 izoformák RNS-ét RT-PCR segítségével amplifikáltuk, a keletkezett amplimereket poliakrilamid gélelektroforézissel különítettük el egymástól, majd a gélből kinyertük az egyes variánsokat. Az így kapott cDNS-eket olyan restrikciós enzimekkel hasítottuk, amelyeknek a CD46-ra specifikus felismerőhelyekkel rendelkeztek. A betegek szérum mintáiból elvégeztük a kanyaróvírus ellenes IgG ellenanyag szintek meghatározását ELISA segítségével.

2. TNF- α receptorok polimorfizmusának vizsgálata: n=80; férfiak n=29; nők n=51 (otosclerosis n=40; nem-otosclerosis n=40). A műtéti úton eltávolított stapesekből szövettani metszeteket készítettünk, amelyeket hagyományos haematoxylin-eozin festéshez

és TNFRI/TNFRII specifikus immunofluoreszcens vizsgálatokhoz használtunk fel.

3. Apoptózis markerek vizsgálata: n=40; férfiak n=17; nők n=23 (otosclerosisos n=27; nem-otosclerosisos n=9; negatív kontroll n=4). A műtéti úton eltávolított stapesekből szövettani metszeteket készítettünk, amelyeket hagyományos haematoxylin-eozin festéshez és hCIAP1, hCIAP2, és Granzyme- β specifikus immunofluoreszcens vizsgálatokhoz használtunk fel.

EREDMÉNYEK

1. A kanyaróvírus genom kimutatása és a CD46 izoformák expressziójának vizsgálata:

A kanyaróvírus eredetű RNS-t csak és kizárólag a szövettanilag is otosclerosisosnak bizonyult stapes talpak esetében sikerült kimutatnunk, a nem otosclerosisos minták minden esetben vírus negatívak voltak. Minden minta (n=51) ugyanazon öt CD46 izoforma expressziójával volt jellemezhető (c, d, e, f, és egy eddig ismeretlen rövidebb variáns). A szövettanilag is otosclerosisosnak bizonyult minták esetében (n=21) az „f” és az ismeretlen rövidebb izoforma emelkedett relatív expresszióját tapasztaltuk a nem-otosclerosisos (n=30) mintákhoz viszonyítva. Az ELISA vizsgálatok során a kanyaró-ellenes ellenanyag (IgG) mennyisége szignifikánsan

alacsonyabb (medián: 6,9 IU/ml) volt az otosclerosisos betegek szérumában, mint a vírus negatív, nem-otosclerosisos kontrollok esetében (medián: 142 IU/ml) .

2. TNFRI/TNFRII receptorok expressziójának vizsgálata:

A szövettanilag aktív (grádus I-II) (n=24) otosclerosisos minták a TNFRII fokozott expressziója mellett a TNFRI mérsékelt kifejeződésével voltak jellemezhetőek. A szövettanilag inaktív (grádus III-IV) (n=16) otosclerosisos minták a TNFRI-et permanens módon expresszálták, azonban a TNFRII specifikus immunreakció ezen minták esetében gyakorlatilag hiányzott. A nem-otosclerosisos stapes mintákban a TNF- α receptorok elhanyagolható mértékben fejeződtek ki az immunfluoreszcens vizsgálatok eredményei alapján. Ezek alapján megállapítható, hogy a TNF- α receptorok kifejeződése szoros összefüggést mutatott az otosclerosis szövettani aktivitásával, amelyet Yates-korrigált χ^2 teszttel is ellenőriztünk ($p < 0,001$).

3. Apoptózis markerek expressziójának vizsgálata:

A szövettanilag aktív (n=19) minták az apoptózis inhibitor fehérjék (hCIAP1/hCIAP2) markáns expressziójával voltak jellemezhetőek, a Granzyme- β expressziója azonban elhanyagolható volt ezen minták esetében. A szövettanilag inaktív otosclerosisos minták esetében fordított helyzet volt tapasztalható, ugyanis a Granzyme- β erőteljes expressziója mellett az apoptózis inhibitor

fehérjék expressziója gyakorlatilag hiányzott. Az egészséges és a nem-otosclerosis (n=21) stapes minták esetében nem tapasztaltunk számottevő mértékű Granzyme- β immunreakciót, s az apoptózis inhibitor fehérjék is csak mérsékelt immunreakciót mutattak. Az apoptózissal összefüggésbe hozható fehérjék expressziója szoros összefüggést mutatott az otosclerosis diagnózisával és szövettani status-ával, amelyet Yates-korrigált χ^2 teszttel is ellenőriztünk ($p < 0,001$).

MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteinkkel igazoltuk a kanyaróvírus eredetű RNS jelenlétét a szövettani vizsgálattal megerősített otosclerosis stapes mintákban. Ez az otosclerosisra jellemző vírus-asszociáció teljes mértékben független volt az otosclerosis csontátépülés kórszövettani aktivitásától. A szövettanilag nem-otosclerosis stapes mintákban a virális RNS kimutatása sikertelen volt. A kanyaróvírus negatív, nem otosclerosis stapes fixációk szövettanilag leginkább degeneratív kórfolyamatok eredményei lehetnek. Az otosclerosis egyik fő kóroki tényezője az emberi capsula oticában zajló, krónikus, perzisztáló kanyaróvírus replikáció lehet. A kanyaróvírus eredetű antigének folyamatos kifejeződése a celluláris immunválasz állandó stimulációját eredményezi, ami az érintett csontszövetben megjelenő gyulladásos reakcióval és következményes sejtkárosodással jár. Mindezek a folyamatok tehát

másodlagosak, hiszen a defektív kanyaróvírus képtelen közvetlen szövetkárosító hatást kifejteni. Azok az immunológiai ingerek, amelyek az antigének által aktivált CD3 és CD46 molekulákon keresztül hatnak, alapvető szerepet játszanak a regulator T-helper 1 (rTh1) sejtek differenciálódásában és aktiválódásában. Ezek a szabályozó funkcióval rendelkező sejtek fontos szerepet töltenek be az autoreaktív, cytotoxicus CD8⁺ T-sejtek eliminációjában. A regulator T-sejt populáció inaktiválódása, vagy elégtelen differenciálódása csökkentheti, illetve meg is szüntetheti a természetes saját szöveti toleranciát, amely különböző autoimmun betegségek kialakulásához vezet. Az ismeretlen rövid CD46 “splicing” variáns valószínűleg egy az újonnan felismert otosclerosissal kapcsolódott izoformák közül. Ezen otosclerosis specifikus CD46 variánsok jelenléte az emberi capsula otica sejteinek felszínén, valószínűleg elégtelenné teszi a kanyaróvírus antigének által aktivált CD3-CD46 receptor complex működését a regulátor T-helper 1 sejtek differenciálódásában. Ezen molekuláris szintű események eredményezhetik a capsula otica ellen kialakuló másodlagos autoimmun reakciót, amely végső soron következményes szenzineurális halláscsökkenést okoz. A CD46 “splicing” variánsok restriktív elemzése további információkkal szolgált az otosclerosis- és a nem-otosclerosis stapes fixációk kanyaróvírus receptor ko-expressziós mintázatát illetően. Az otosclerosis és a nem-otosclerosis stapes fixációkat ugyanazon öt CD46 izoforma együttes expressziója jellemezte, azonban az expressziós mintázatok a kórszövettani lelettel összefüggő

megjelenést mutattak. A stapes talp mintákban a “c”, “d”, “e” és “f” variánsokat, valamint egy ismeretlen, az eddig leírt variánsoknál lényegesen rövidebb izoformát azonosítottunk. A nem-otosclerosis stapes fixációkkal szemben, az otosclerosis esetén az “f” variáns és az ismeretlen variáns fokozott expresszióját tapasztaltuk. Az alternatív “splicing” következtében az “f” variáns mRNS-éből hiányzik a 13-as exon. Ez az exon kódolja a CD46 receptor cytoplasmaticus doménjének nagyobbik részét. Ez a domén felelős a receptor aktivációt követő intracelluláris foszforiláz-mediált jelátvitelért. A 13-as exon hiánya módosult, illetve kóros intracelluláris jelátvitelt eredményezhet. Az intracelluláris szignáltranszdukciós folyamatok szövetspecifikus megváltozása felelős lehet a perzisztáló kanyaróvírus fertőzések kialakulásáért.

Megfigyeléseink további információval szolgálnak az otosclerosis gyulladásos pathogenezisének és a különböző kórszövettani stádiumok átmeneteinek molekuláris hátterét illetően. Az otosclerosis korai stádiumaiban észlelhető, fokozott I-es és II-es típusú TNF- α receptor expresszió a gyulladásos és osteolyticus kaszkád aktiválódását eredményezi. Számos gyulladásos citokin (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, TGF- β) és a csontspecifikus szabályozó fehérje (osteoprotegerin [OPG], bone morphogenetic protein [BMP], dystrophic dysplasia sulfate transporter [DDST]) további másodlagos szerepet játszhat ebben a folyamatban. A felfokozott csontátépülés végpontja az osteoid állomány sejtes elemeinek eltűnését eredményező apoptózis (kiégett otosclerosis). Visszatérve korábbi és jelenlegi eredményeinkhez, hangsúlyozzuk, hogy az otosclerosis

és a nem-otosclerosis stapes fixációk pathogenezeise teljes mértékben különbözik. Az otosclerosis csontátépülési zavar organotropizmust mutat a capsula otica iránt. Az otosclerosis góccok kizárólag a temporális csontban jelennek meg, a belsőfül csontos részletein kívül, sehol sem észlelhetők. Ennek valószínűleg fejlődéstani okai lehetnek. A capsula otica, és a stapes talp enchondrális típusú csontosodása a születést követő egy évben fejeződik be. A csontosodás befejeztével a capsula oticában, normális körülmények között nem észlelhető a csontrendszerre egyébként jellemző folyamatos csontátépülés. A capsula otica szövettanilag három rétegből épül fel: 1. a perilympa térhez közel eső endosteális réteg; 2. globuli interossei, mely embrionális porcmaradványnak tekinthető; 3. periosteális réteg. Az otosclerosis kialakulása valószínűleg a középső rétegben kezdődik el. A capsula oticával szemben a stapes talp csak két rétegből épül fel, mivel az endosteális réteg hiányzik. A stapes talp vestibuláris felszínét borító hyalinporc réteg a capsula otica középső rétegének felel meg, és mint ilyen, embrionális maradványnak tekinthető. Az otosclerosis góccok osteoclastjait differenciálatlan, embrionális fenotípus jellemzi (CD51/61 antigén expresszió) szemben a nem-otosclerosis stapes fixációkkal. A szokatlan CD51/61 antigén expressziót mutató osteoclastok a capsula otica középső rétegének nyugvó embrionális-típusú sejteiből származhatnak. Ez a celluláris transzformáció érthetővé teszi a globuli interossei, otosclerosis góccokban tapasztalható hiányát. A globuli interosseit képző, chondrocyta-szerű sejtek igen alacsony metabolikus aktivitással rendelkeznek, és

számottevő morfológiai változások nélkül, egész életen át perzisztálnak. Korábbi feltételezéseinknek megfelelően, ezeket a sejteket pluripotens embryonális maradványokként foghatjuk fel, amelyek a kanyaróvírus ellen adott gyulladásos válasz során reaktiválódva osteoclastokká alakulhatnak át. Jelen megfigyeléseink az otosclerosis különböző stádiumaiban és a stapes talpak hyalinporc rétegében észlelhető TNF- α kifejeződéssel kapcsolatban, alátámasztják a fenti elméletet. Azonban a jövőben további *in vitro* vizsgálatok és szövettenyésztés szükségesek az elmélet bizonyításához.

Megfigyeléseink jól illeszkednek az osteoclast-TNF- α -RANK tengely molekuláris szintű interakcióinak korábban leírt zavarához. A hCIAP1 és hCIAP2 fehérjék fokozott expressziója lehet a molekuláris válasz a az aktív otosclerosisban megfigyelt, NK-sejtek és osteoclastok által mediált intenzív TNF- α felszabadulásra. A TNF- α hozzákötődik a saját ún. “decoy” receptoraihoz (TNFRI és TNFRII), aktiválja a TNF- α asszociált faktorokat (TRAF1 és TRAF2) és változatos death domének aktivációjával feltartóztathatatlanul elindítja a programozott sejthalál folyamatát. Az apoptosis inhibitor fehérjék nem lépnek közvetlen kapcsolatba a TNF- α receptorokkal, azonban biológiai hatásukat közvetve a TRAF1 és TRAF2 inaktivációjával gátolják. Ezenkívül a hCIAP1 és a hCIAP2 közvetlenül képes a TNF- α receptor által aktivált kaszpáz-3 és kaszpáz-7 fehérjékhez kötődni, teljes mértékben gátolva ezzel proteolyticus aktivitásukat. Az apoptosis inhibitor fehérjék patológiásan megemelkedett expressziója végül fokozott sejt-

túlélést, sejtproliferációt és kiterjedt osteoclast aktivációt okoz. Korábbi tanulmányok szerint egy aktív otosclerosisos góc átlagos élettartama 5-7 év között mozog. Ezen időszak alatt a TNF- α –és a következményes hCIAP válasz lassan kimerül, amely az otosclerosisos góc csökkenő vascularisációjában és az osteoclastok inaktivációjában nyilvánul meg. 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⁺ T-lymphocyták további akkumulációt mutatnak. Ez a stádium az otosclerosis szövettani értelemben vett gyógyulása (“histological healing”); azonban molekuláris szinten sejtdestrukción zajlik, amely az NK-sejtek és cytotoxicus T-sejtek által felszabadított Granzyme- β -nek és a perforinoknak köszönhető. Elkezdődik az immun-mediált apoptózis molekuláris kaszkádja, miközben a fokozódó osteoprotegerin felszabadulás további calcificációt eredményez. A cement vonalak fonatos, koncentrikus szerkezete az inaktív otosclerosisra jellemző lamelláris mintázatba megy át. A felfokozott csontátépülés végpontja az osteoid alapállomány sejtes elemeinek eltűnését eredményező apoptózis (kiégett otosclerosis).

Napjainkban a sebészi megoldások (stapedectomy, stapedotomy) jelentik az otosclerosisos halláscsökkenés elsődleges kezelését. Azonban figyelembe véve a betegség autoimmun-gyulladásos jellegzetességeit és a csontanyagcsere érintettségét, a gyógyszeres kezelés, amely magában foglalja az osteoporosis-ellenes, immunszuppresszív- és gyulladás-ellenes szereket, hatásos

lehet az otosclerosis korai, aktív stádiumaiban. Jelen megfigyeléseink alátámasztják a TNF- α és receptorai központi szerepét az otosclerosisban észlelhető gyulladásos csontátépülés pathogenezisében. Mivel az otosclerosisos csontban proinflammatorikus cytokinek – elsősorban TNF- α – termelődnek, a biológiai szerek (anti- TNF- α antitest) helyi, vagy szisztémás alkalmazása szóba jöhet az otosclerosis aktív stádiumait kísérő szenzörineurális halláscsökkenés kezelésében. Jelenleg egy tanulmány tárgyalja az infliximab (anti- TNF- α antitest) intratympanalis perfúziójának autoimmun szenzörineurális halláscsökkenésben (autoimmune inner ear disease, AEID) észlelhető klinikai hatékonyságát. Ebben a tanulmányban 9 olyan AEID-ben szenvedő beteg szerepel, akiket vagy nem kezeltek kortikoszteroiddal, vagy kezeltek ugyan, de a szteroid megvonás után relapsus jelentkezett. Az infliximab kezelés négy héten keresztül, heti egy alkalommal történt. A halláseredmények minden betegnél javultak és a TNF-blokkoló elhagyása után szteroid kezelésre már nem volt szükség. Az infliximab kezelés után, a halláslelet 7 beteg esetén teljes remissziót mutatott. Állatkísérletes tanulmányok alapján egy rövid távú rekombináns OPG (OPG-Fc) kezelés – anti-osteolyticus hatásai révén -, szintén alkalmas lehet az otosclerosis korai stádiumainak kezelésére. Összességében a RANK-tengely által mediált osteolysis gátlása, újból normális csontremodellációt eredményezhet az otosclerosis által érintett csontban. 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. *Brookler és mtsai.* igazolták az etidronát hatásosságát az otosclerosist kísérő szenzorineurális halláscsökkenés kezelésében. Az otosclerosis pathogenezisével kapcsolatos jelen tudásunk szerint az anti-TNF- α szerek rendelkezhetnek a legspecifikusabb támadásponttal és a legnagyobb hatékonysággal az otosclerosisos csontátépülési zavar gátlásában.

ÚJ MEGFIGYELÉSEK

1. A capsula otica egyedi CD46 expressziós mintázatának meghatározása RT-PCR és restrikciós analízis segítségével. Az otosclerosisban tapasztalható csökkent kanyaróvírus ellenes IgG szint kimutatása ELISA technikával.
2. Az otosclerosist kísérő fokozott TNF- α receptor expresszió igazolja az aktivált osteoclastok intenzív anyagcseréjének és a gyulladásos reakcióutaknak a szerepét a betegség pathogenezisében. A TNF- α központi szerepet játszik a betegség kezdeti és a késői szakasza közötti átmenetben. Ezért fontos terápiás célpont lehet, a betegség korai, aktív fázisában.
3. Az otosclerosis szövettanilag aktív és inaktív szakaszában az apoptózis inhibitorok (hCIAP1, hCIAP2) és inducereket (Granzyme- β) expressziója ellentétes, ez a sejtek túlélésének/apoptózisának szabályozási zavarait feltételezi az

otosclerosisban. A vizsgált apoptózis inhibitoroknak és inducereknak szintén kulcsfontosságú szerepe van a betegség aktív és inaktív szakasza közötti átmenetben különös tekintettel annak időbeni lefolyására.

Iktatószám: DEENKÉTK/111/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Csomor Péter

Neptun kód: PMG47E

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Csomor, P.**, Sziklai, I., Liktör, B., Z. Szabó, L., Pytel, J., Jóri, J., Karosi, T.: Otosclerosis: Disturbed balance between cell survival and apoptosis.
Otol. Neurotol. 31 (6), 867-874, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MAO.0b013e3181e3dedf>
IF:2.065
2. **Csomor, P.**, Sziklai, I., Karosi, T.: TNF-[alpha] receptor expression correlates with histologic activity of otosclerosis.
Otol. Neurotol. 30 (8), 1131-1137, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MAO.0b013e3181be6af4>
IF:1.435
3. **Csomor, P.**, Szalmás, A., Kónya, J., Sziklai, I., Karosi, T.: Restriction analysis of otosclerosis-associated CD46 splicing variants.
Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 267 (2), 219-226, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-009-1042-4>
IF:1.167



További Közlemények

4. **Csomor, P.**, Liktör, B., Liktör, B., Szekanecz, Z., Sziklai, I., Karosi, T.: Expression of bone morphogenetic protein 2, 4, 5, and 7 correlates with histological activity of otosclerotic foci.
Acta Oto-Laryngol. Epub ahead of print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/00016489.2011.653669>
IF:1.2 (2010)

5. Karosi, T., **Csomor, P.**, Sziklai, I.: Tumor necrosis factor-alfa receptor expression correlates with mucosal changes and biofilm presence in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis.
Laryngoscope. 122 (3), 504-510, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/lary.23190>
IF:2.096 (2010)

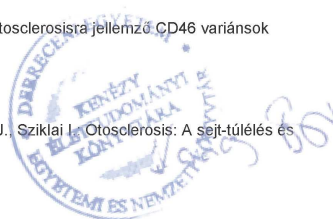
6. **Csomor, P.**, Liktör, B., Liktör, B., Sziklai, I., Karosi, T.: No evidence for disturbed COL1A1 and A2 expression in otosclerosis.
Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryn. Epub ahead of print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-011-1859-5>
IF:1.214 (2010)

7. **Csomor, P.**, Sziklai, I., Karosi, T.: Controversies in RELN/reelin expression in otosclerosis.
Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryn. 269 (2), 431-440, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-011-1653-4>
IF:1.214 (2010)

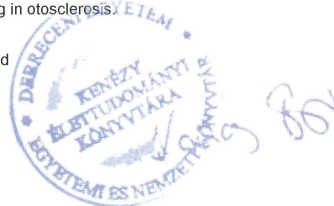
8. Toth, L., **Csomor, P.**, Sziklai, I., Karosi, T.: Biofilm detection in chronic rhinosinusitis by combined application of hematoxylin-eosin and gram staining.
Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryn. 268 (10), 1455-1462, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-011-1623-x>
IF:1.214 (2010)

9. **Csomor P.**, Szalmás A., Kónya J., Karosi T., Sziklai I.: Az otosclerosisra jellemző CD46 variánsok molekuláris biológiai jellemzése.
Fül-Orr-Gégégyógy. 56 (1), 221-230, 2010.

10. **Csomor P.**, Karosi T., Liktör B., Z. Szabó L., Pytel J., Jóri J., Sziklai I.: Otosclerosis: A sejt-túlélés és az apoptózis szabályozásának zavara.
Fül-Orr-Gégégyógy. 56 (2), 72-80, 2010.



11. Karosi, T., **Csomor, P.**, Szalmás, A., Kónya, J., Petkó, M., Sziklai, I.: Osteoprotegerin expression and sensitivity in otosclerosis with different histological activity.
Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryn. 268 (3), 357-365, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-010-1404-y>
IF:1.214
12. Karosi T., **Csomor P.**, Szekanecz Z., Sziklai I.: Az otosclerosis etiopathogenezeise.
Fül-Orr-Gégégyógy. 56 (4), 218-233, 2010.
13. **Csomor P.**, Karosi T., Pytel J., Jóri J., Z. Szabó L., Liktör B., Sziklai I.: A TNF-alfa receptor expresszió összefügg az otosclerosis szövettani aktivitásával.
Fül-, Orr-, Gégégyógy. 55 (4), 176-184, 2009.
14. Karosi T., **Csomor P.**, Z. Szabó L., Liktör B., Petkó M., Pytel J., Jóri J., Sziklai I.: A nem otosclerosisos stapes fixációk kórszövettani osztályozása.
Fül-Orr-Gégégyógy. 55 (3), 110-120, 2009.
15. Karosi T., **Csomor P.**, Szalmás A., Kónya J., Z. Szabó L., Liktör B., Petkó M., Pytel J., Jóri J., Sziklai I.: Új, otosclerosis-specifikus CD46 variánsok: Az otosclerosisos csontátépülés genetikai alapja?
Fül-Orr-Gégégyógy. 55 (1), 17-27, 2009.
16. Karosi, T., **Csomor, P.**, Petkó, M., Liktör, B., Z. Szabó, L., Pytel, J., Jóri, J., Sziklai, I.:
Histopathology of Nonotosclerotic Stapes Fixations.
Otol. Neurotol. 30 (8), 1058-1066, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MAO.0b013e31819fe802>
IF:1.435
17. Karosi T., Tóth Á., **Csomor P.**, Sziklai I.: Differenciáldiagnosztikai nehézséget okozó, retrochoanális orrpoly: Esetismertetés.
Fül-Orr-Gégégyógy. 55 (4), 164-168, 2009.
18. 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.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MLG.0b013e31817c133d>
IF:1.877



Összesített impakt faktor: 16.131

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 4.667

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudánymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.04.06

