

# A csontmorfogenetikus fehérjék (BMP 2, 4, 5, 7) expressziója összefüggést mutat az otosclerosis szövettani aktivitásával

Csomor Péter dr.<sup>1</sup>, Liktör Balázs dr.<sup>2</sup>, Liktör Bálint dr.<sup>2</sup>, Szekanecz Zoltán dr.<sup>3</sup>, Sziklai István dr.<sup>1</sup>, Karosi Tamás dr.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DE OEC, FÜL-ORR-GÉGÉSZETI ÉS FEJ-NYAKSEBÉSZETI KLINIKA, DEBRECEN

<sup>2</sup>BAJCSY-ZSILINSZKY KÓRHÁZ, FÜL-ORR-GÉGE OSZTÁLY, BUDAPEST

<sup>3</sup>DE OEC, REUMATOLÓGIAI TANSZÉK, DEBRECEN

## ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen tanulmány elsőként állapítja meg, hogy a csont morfogenetikus fehérje 5-ös altípusa (bone morphogenetic protein-5; BMP5) részt vesz az otosclerosis patogenezisében. Eredményeink megerősítik, hogy a transzformáló növekedési faktor-béta (transforming growth factor-beta; TGF- $\beta$ ) szupercsalád BMP tagjainak magas expressziós szintje közrejátszik a kórosan emelkedett csontátépülésben az otosclerosis korai, aktív fázisában. Az otosclerosis az otikus kapszula komplex csontátépülési zavara, amely a különböző BMP-k fokozott expressziójával jellemezhető. A TGF- $\beta$  és a BMP altípusok a TGF- $\beta$  szupercsalád tagjai és központi szerepet játszanak a csontreszorpcióban és a csontújdonképződésben. Korábbi tanulmányok alapján feltételezték, hogy a BMP-k és receptoraik részt vehetnek az otosclerosisban megfigyelhető patológiásan megnövekedett csontátépülésben. Tanulmányunkban 51 otosclerosisos és 16 nem otosclerosisos ankylotikus stapedal került elemzésre: hagyományos hematoxilin-eozin festés és BMP2, 4, 5 és 7 specifikus immunfluoreszcens vizsgálat történt. Kortikális csontfragmentumok (n=35) és incus minták (n=6) jelentették a negatív kontrollt. Az aktív otosclerosist (n=39) megnövekedett BMP2, 4, 5 és 7 expresszió jellemezte, azonban a szövettanilag inaktív otosclerosisban (n=12) nem sikerült BMP-re specifikus immunreakciót kimutatni. A nem otosclerosisos stapes minták (n=16) és a negatív kontrollok (n=41) elhanyagolható BMP expressziót mutattak. Összefoglalva, a BMP expressziós mintázat szoros összefüggést mutatott az otosclerosis szövettani aktivitásával.

## KULCSSZAVAK

BONE MORPHOGENETIC PROTEIN, CSONTÁTÉPÜLÉSI ZAVAR, SZÖVETTAN, NEM OTOSZKLEROTIKUS STAPES FIXÁCIÓ, OTOSCLEROSIS

## The bone morphogenetic proteins (BMP 2, 4, 5, 7) show the correlation of histological activity

### SUMMARY:

This study is the first to establish that BMP-5 plays a role in the pathogenesis of otosclerosis. These results confirm that elevated expression levels of BMPs, members of TGF- $\beta$  superfamily, contribute to the pathologically increased bone turnover in early, active stages of otosclerosis. Otosclerosis is a complex bone remodeling disorder of the otic capsule, which might be characterized by increased expression of different types of bone morphogenetic proteins (BMP). Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  and BMP both are members of TGF- $\beta$  superfamily and play a critical role in bone resorption and new bone formation. It has been suggested that BMP and its receptors (BMPR) may be involved in the pathologically increased bone turnover observed in otosclerosis. Fifty-one otosclerotic and sixteen non-otosclerotic ankylotic stapes footplates were histologically analyzed: conventional hematoxylin-eosin staining and BMP2, 4, 5 and 7-specific immunofluorescent assays were performed. Cortical bone fragments (n=35) and incus specimens (n=6) were applied as negative controls. Active otosclerosis (n=39) was featured by increased expression of BMP2, 4, 5 and 7. Inactive cases of otosclerosis (n=12) were characterized by negative immunoreaction for BMPs. Non-otosclerotic stapes specimens (n=16) and negative controls (n=41) showed a negligible BMP expression. The BMP expression pattern displayed a strong correlation with the histological activity of otosclerosis.

## KEYWORDS

BONE MORPHOGENETIC PROTEIN, BONE REMODELING DISORDER, HISTOLOGY, NON-OTOSCLEROTIC STAPES FIXATION, OTOSCLEROSIS

Levelező szerző:

Karosi Tamás dr.

DE OEC, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika  
4032 Debrecen, Nagyerdei Krt. 98.

Tel.: +36/52-255-805, Fax: +36/52-255-809

Mobil: +36/20-969-0590

Web: www.fulorrgege.deoec.hu, www.rcmm.dote.hu

Email: karositamasa@gmail.com

Az otosclerosis egyedülálló módon a humán otikus kapszulához kötött csontremodellációs betegség, amely a csontreszorpció és csontújdonképződés kényes egyensúlyának zavarával jellemezhető (1, 2). Az otoszklerotikus fókuszok általában a stapedal elülső pólusában és a pericochleáris régióban jelennek meg. A betegség a stapedal fixációja és a pericochleáris csontle bomlás következtében progresszív vezetékes- és/vagy szenzorineurális halláscsökkenéssel jár (1). A fissa ante fenestram gyakran fibrózus szövetet és éretlen porcot is tartalmaz, ezért preformált anatómiai ré-

góként mind a stapediális, mind a cochlearis otosclerosis predilekciós helye (1). A betegség szigorúan a humán otikus kapszulára korlátozódik: a belseőül csontos tokján kívül, otosclerosis-szerű csontlézióról még nem számoltak be (1, 3). A kaukázusi fehér populációban az otosclerosis viszonylag sok halláskárosodásnak áll a hátterében, előfordulási gyakorisága 0,3-0,4% (1). Jóval sűrűbben figyelhető meg a szövettani otosclerosis széles körű, nem szelektált kórbonctani vizsgálatok szerint 8-11%-ban (3). Korábbi tanulmányok alapján megállapítható, hogy a vezetékes halláscsökkenéssel járó stapes ankylosisoknak körülbelül 60%-át otosclerosis okozza (1, 4). Számos hipotézis vet fel lehetséges kapcsolatot vírális, gyulladáshoz, autoimmun, metabolikus és genetikai faktorokkal, azonban az otosclerosis etiopatogenezise mind-ezidáig tisztázatlan maradt (1, 5, 6).

Az elmúlt évtizedekben számos genetikai hajlamosító faktorról tudósítottak (1, 6). Kapcsoltsági tanulmányok szerint a stapes fixációban szenvedő betegek familiáris halmozódása autoszómális domináns öröklődést mutat inkomplett penetranciával, és ezen vizsgálatok segítettek elő a 10 otosclerosis-asszociált lókuszt (OTSC1-10) feltérképezését (1, 6). Az OTSC1-10 lókuszt az otosclerosisral hozták összefüggésbe; annak ellenére, hogy specifikus géneket vagy fehérjetermékeket nem azonosítottak (1, 6). Az otosclerosis a legtöbb betegben nem követi a szabályos Mendeli-szegregációt, ezzel is azt sugallva, hogy ezt a komplex betegséget szorosan összefonódott környezeti és genetikai faktorok együttesen válthatják ki (1, 6). Az otosclerosis kialakulásában az 1-es típusú kollagen A1 és A2 alléljei (COL1A1/A2), a bone morphogenetic proteinek (BMP2, 4, 7) különböző formái, a transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), a kanyaróvírus CD46 receptora és a RELN gének is szerepet játszhatnak (7-11). Azonban a női dominanciát, a felnőttkori kezdetet és a szervspecifitást a korábban említett genetikai tényezők egyike sem magyarázza (1, 6, 7, 11).

Az elmúlt 5 év során számoltak be a BMP-k és receptorai (BMPR) közreműködéséről az otosclerosis patogenezisében (8, 12). A TGF- $\beta$  szupercsaládba tartozó BMP-k valójában növekedési faktorok, amelyek gyulladáshoz citokineként is viselkedhetnek. Mára 20 különböző BMP izoformát fedeztek fel, mindazonáltal csak 6 (BMP2-7) funkcionál csontspecifikus növekedési faktorként. A BMP1 egy mátrix metalloproteáz, így nem áll szoros kapcsolatban más ismert növekedési faktorokkal. A BMP2-7 az enchondrális csontosodásban, az új csont felépítésben és a helyreállításban játszanak nélkülözhetetlen szerepet. A BMP2-7-et embrionális kondrociták, oszteoid prekurzor sejtek, preoszteoklasztok és gyulladáshoz T-sejtek szekretálják (13, 14). Fiziológiásan a BMP-k diszulfid-kötéssel homodimereket alkotnak, és receptoraikon keresztül elősegítik a csont- és porc képződést (12-14). Az aktivált BMPR-k a szignál transzdukciós folyamatot mediálják, ezzel vezetnek az SA (Sma és Mad kapcsolt proteinek) fehérjék mozgósításához és toborzásához (13, 14). Végezetül pedig SA indukált TGF- $\beta$ 1 expresszió alakul ki (14). A TGF- $\beta$  szupercsaládon belül a csontforgalom elengedhetetlen szabályzója a BMP-k és a TGF- $\beta$ 1. Ráadásul egy inverz kölcsönhatást figyeltek meg a BMP és a TGF- $\beta$ 1 út vonalain között (13, 14). A BMP jelátvitel megszakadása, vagy különféle mutációk a BMP-ben és gátlószerekben (noggin, chordin, sclerotisin) változatos csontbetegségekkel állnak kapcsolatban, beleértve a fibrodysplasia ossificans progressivát (FDOP) és a veleszületett stapes fixációt többszörös synostosis symphalangismus szindrómával (MSSS) (14, 15). Az emelkedett BMP expresszió kimutatása otosclerosisban alátámaszthatja az „embrionális porc reaktiválódásának” hipotézisét a betegség patogenezisében.

Jelen tanulmány az otosclerosisos és nem otosclerosisos stapedalpakban megjelenő különböző típusú BMP-k expressziós

szintjét és mintázatát vizsgálta, hogy megmagyarázhatja a BMP-k tényleges szerepét az otosclerosis patogenezisében.

## Anyagok és módszerek

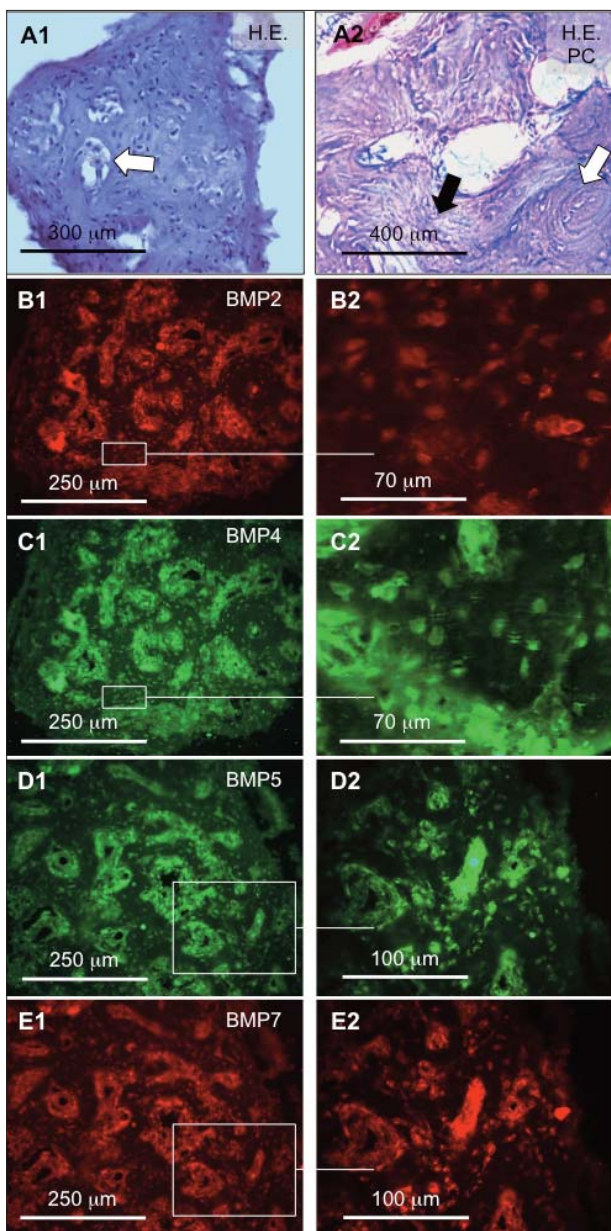
### Betegek és kontroll minták

Stapedectomy során eltávolított, összesen 67 stapedalpak (n=67, férfi=26, nő=41) került analízisra. A betegek átlagos életkora 42,28 évnek (25-65 év) bizonyult. A hallócsont-láncolat fixáció diagnózisa klinikai vizsgálatok, audiológiai és tympanometriai leletek alapján történt. 1000 Hz-en a csont-lég köz legalább 30 dB-nek mutatkozott tiszta hang audiometriával mérve. A stapes fixációs esetek 79,1%-ában (n=53) As-típusú, míg 20,9%-ában (n=14) A-típusú tympanogramot mutatott ki a preoperatív analízis. Klinikailag a stapes fixáció 44 betegnél (65,7%) kétoldalú bizonyult, azonban minden betegről csak egy stapes mintát használtunk fel. Részlegesen eltávolított stapedalpak nem kerültek a vizsgálatba, mert a stapes fixációt okozó, mellső vagy hátsó pólsban elhelyezkedő csontléziók visszamaradtak az ovális ablak fülkéjében. A darabokra tört, majd helyreállított minták azonban nem kerültek a kizárt csoportba. A stapedalpak BMP expressziójának szövetspecifikus kontrolljaként 35 kortikális csontfragmentumot gyűjtöttünk a külső hallójáratból laterális atticotomia során és 6 darab incus canal-wall-down (CWD) mastoidectomy hozományaképpen. A kortikális csontokat stapes ankylosis betegekben nyertük, míg az incus mintákhoz középfül cholesteatoma műtete során jutottunk. A stapedalpak és a kontroll szöveti minták összegyűjtése 2009. december és 2011. március között zajlott (DE OEC Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika, Debrecen, Magyarország; Bajcsy-Zsilinszky Kórház Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Osztály, Budapest, Magyarország). Minden páciens írásos és tájékoztatott beleegyezését adta a tanulmányhoz. A Magyar Tudományos Kutatás Etikai Bizottsága (ETT-TUKEB 84-227/2008-1018EKU) engedélyezte a vizsgálatot. A tanulmány a Helsinki Deklaráció szerint ment végbe.

### BMP2, 4, 5 és 7 specifikus immunfluoreszcens analízis

Össességében 67 ankylotikus stapes, 35 kortikális csontfragmentum és 6 incus mintát 10%-os (m/v) pufferolt formaldehid oldatban fixáltuk, majd 0,5 M-os Na-EDTA (nátrium etiléndiamino-tetraacetát, 72 óra, 4 °C) és 0,02%-os (m/v) nátrium-azid oldatban dekalcináltuk. A mintákat 15%-os (m/v) analitikai tisztaságú zselatinba ágyztuk (24 óra, 56 °C), majd 4%-os (m/v) paraformaldehid oldatban újrafixáltuk (24 óra, 20 °C). A szövettani blokkok krioprotekciójáról 20%-os (m/v) szacharóz oldat (2 óra, 4 °C) gondoskodott. A 10  $\mu$ m vastagságú metszetek -25 °C-on készültek (MNT-200, Slee, Mainz, Németország). A szelleteket 0,1 M-os PBS (foszfát-pufferolt szalina) és 0,03 %-os (m/v) nátrium-azid oldatban 4 °C-os hőmérsékleten tároltuk. Öt egymást követő 10  $\mu$ m vastagságú fagyasztott metszetet a következőképpen vizsgáltunk: (1) hematoxilin-eozin festés (HE); (2) BMP2, (3) BMP4, (4) BMP5 és (5) BMP7 specifikus immunfluoreszcens próba (IFA). Először minden egyes mintából nyert metszetet hagyományos HE festéssel dolgoztunk fel. Az IFA metszetek sorozatát kimostuk és Power Block™ Reagent-be (BG-BS-1310-25, Biogenex, Fremont, CA, USA) ágyztuk. A blokkba ágyazott metszeteket 1:20 monoklonális egér antihumán BMP2 primer antitest oldattal (20 °C, 24 óra, folyamatos rázás) (RD-MAB2260, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 1:20 poliklonális kecske antihumán BMP2/4 primer antitest oldattal (20 °C, 24 óra, folyamatos rázás) (RD-AF355, R&D Systems), 1:20 poliklonális kecske antihumán BMP5 primer antitest oldattal (20 °C, 24 óra, folyamatos rázás) (RD-AF615, R&D

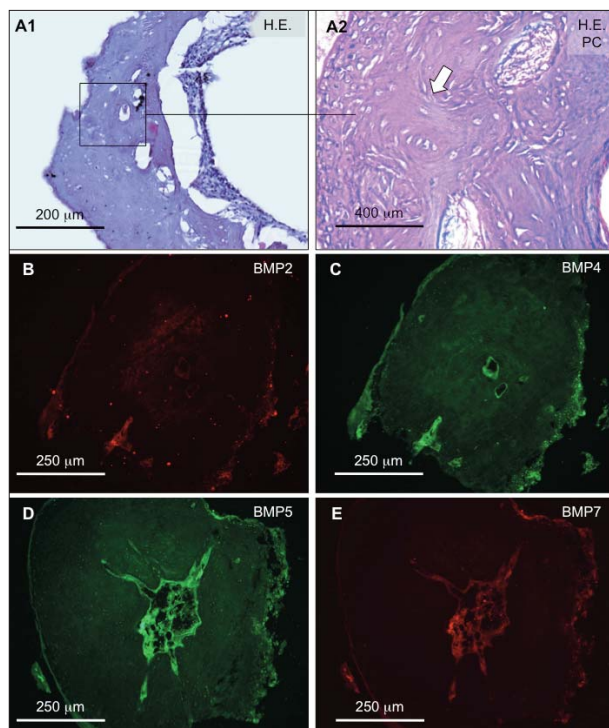




**1. ábra: Aktív otosclerosisban a BMP expressió immunfluoreszcens demonstrációja**

(A1) Aktív otoszklerotikus fókusz hipercelluláris oszteoiddal és számos pszeudovaszkuláris térrel (fehér nyíl) (HE, jobb fül).  
 (A2) Az előbbi metszet fázis-kontraszt (PC) mikroszkópos nézete. A cementvonalak szabálytalan koncentrikus (fehér nyíl) és fonott (fekete nyíl) mintázatokat mutatnak. BMP2 (B1, B2), BMP4 (C1, C2), BMP5 (D1, D2) és BMP7 (E1, E2) specifikus immunfluoreszcens mikrográfok különböző nagyítással, amelyekben élénk szemcsézett citoplazmatikus immunreakció látszik a léziót létrehozó sejtekben.

Systems), és végül 1:20 monoklonális egér antihumán BMP7 primer antitest oldattal (20 °C, 24 óra, folyamatos rázás) (RD-MAB3542, R&D Systems) inkubáltuk. Az elsődleges antitesteket 0,2 M PBS-sel kimostuk és a metszetek egyenként 1:200 NL-493 fluorochrommal jelölt Northern Lights™ számár anti-kecske IgG-vel (20 °C, 6 óra, folyamatos rázás) (R&D Systems) és 1:200 NL-637 fluorochrommal jelölt Northern Lights™ számár anti-egér IgG-vel (20 °C, 6 óra, folyamatos rázás) (R&D Systems) inkubáltuk. Az összes antitest inkubáció steril, párás kamrában zajlott. A metszeteket UV transzparens médiummal fedtük (Vectashield™, Vector Laboratories, CA, USA). A képfeldolgozást 510 nm-es és 470 nm-es hullámhosszon, 43-77 ms-



**2. ábra: Inaktív otosclerosisban a BMP expressió immunfluoreszcens demonstrációja**

(A1) A stapestalp hátsó pólusában lévő inaktív otoszklerotikus góc (HE, jobb fül). A lézió hipocellularitással és üres sejt körüli udvarokkal jellemezhető.  
 (A2) Az előbbi metszet fázis-kontraszt (PC) mikroszkópos nézete. A cementvonalak lemezes mintázatot mutatnak (fehér nyíl). Oszteoblasztok és oszteoklasztok (empty halo cells) maradványai negatívak BMP2 (B), BMP4 (C), BMP5 (D) és BMP7 (E) specifikus immunfluoreszcens festésre.

os expozíciós idővel, UV fény alatt végeztük és a fényképeket jpeg formátumban archiváltuk (Axioskop2 MOTTM, Axiovision 3.0TM, Zeiss, Jena, Németország). Az egyes metszeteket 10-20 centrálisan fókuszált, nagy nagyítású (x40) mezővel analizáltuk a BMP2, 4, 5 és 7 specifikus immunfluoreszcens reakciók szerint. A szövettani vizsgálatokat két különböző kutató elemelte: C. P a HE, míg K. T. az IFA metszeteket értelmezte. Az otosclerosis hisztopatológiai aktivitásának vizsgálata a cellularitáson és a cementvonalak szerkezetén alapult a HE festett metszeteken. Minthogy az otosclerosis multifokális betegség a stapediális oszteolitikus fókusz hisztopatológiai aktivitása nem felel meg teljes mértékben az otosclerosis klinikai aktivitásának (1, 4). Az otosclerosis diagnózisához a következő hisztopatológiai kritériumokat használtuk: (1) Az aktív otosclerosis széles pszeudovaszkuláris terek; emelkedett számú, megnagyobbodott, alakatlan és sokmagvú oszteoklasztok jellemzik. A cementvonalak fonott mintázatot mutatnak (2). Az inaktív otosclerosis eltömődött vaszkuláris terekkel és reszorpciós lakúnákkal definiálható, melyek csökkent számú oszteoklasztot (üres halosejtek) tartalmaznak. A cementvonalak lemezes mintázatba rendeződnek.

**Eredmények**

Ankylotikus stapestalpak (n=67), kortikális csontfragmentumok (n=35) és incus minták (n=6) elemzését végeztük egyenként BMP2, 4, 5, és 7 specifikus immunfluoreszcens próbával és hagyományos HE festéssel. 51 ankylotikus stapestalp esetében szövettani otosclerosisist állapítottunk meg (1. és 2. ábra, 1. táblázat). A stapestalpak egyetlen, domináns otoszklerotikus fókuszot foglaltak magukban. A minták között 39 stapestalp otoszklerotikus

fókusza aktívnak, míg 12 esetben inaktívnek mutatkozott (1. és 2. ábra, 1. táblázat). Az 51 páciens stapestalpaiban az otoszklerotikus léziók különböző lokalizációban jelentek meg: a mellső pólusban (n=31), a hátsó pólusban (n=7), bipolarisan (n=6) és obliteratív (n=7) módon. A 16 nem otoszklerotikus stapestalp esetében a szövettani vizsgálat annuláris, stapediovestibuláris kalcifikációt tárt fel a stapestalp jelzett megvastagodásával (4) (3. ábra, 1. táblázat). A nem otoszklerotikus betegek klinikai anam-

nézise és otoszkópos képe alapján krónikus középfülgyulladás talaján kialakult tympanoszklerózis és familiáris stapes fixáció zárható.

Az aktív otosclerosis esetek szimultán emelkedett BMP2, 4, 5 és 7 expressziót mutattak, amelyek intenzív granuláris immunreakcióban nyilvánultak meg (1. ábra). Az oszteoblasztok és az oszteoblasztok a különböző típusú BMP-kre tekintélyes pozitívítással reagáltak, ezzel jelezve a lézió belüli aktív csontremodellinget és az új csontképződést (1. ábra). A BMP immunreaktivitás váltakozott a stapes minták különböző részeiben. A szuperstruktúra negatív volt BMP-re, míg a léziót tartalmazó talp és a vestibuláris felszín hyalinporc rétege nagyon hasonló expressziós mintázatot jelzett. Az IFA-re erősen pozitív otoszklerotikus minták BMP expressziójának optimális expozíciós ideje 43 ms-nak mutatkozott. A BMP negatív mintákban (nem otosclerosisos talp, kontroll csont) az expozíciós idő 77 ms-ig lett meghosszabbítva, hogy a fals negatív eredmények elkerülhetőek legyenek. Ezzel szemben inaktív otoszklerotikus fókuszkokban a sejtes maradványok felszínén nem volt szignifikáns BMP expresszió kimutatható (2. ábra). Ezekben az esetekben a BMP expresszió mennyisége és mintázata szorosan korrelált az otosclerosis szövettani aktivitásával (1. táblázat). A nem otoszklerotikus stapes fixációk BMP-re nem ábrázoltak immunreakciót (3. ábra, 1. táblázat). A negatív kontrollként használt kortikális csontok és incus minták szintén negatív BMP-specifikus immunreakciót adtak (4. ábra, 1. táblázat). Végezetül, a különböző típusú BMP-k expressziója szoros kapcsolatban állt az otosclerosis szövettani diagnózisával (1. táblázat).

**1. táblázat: Az ankylotikus stapestalpak és a kontroll minták BMP2, 4, 5 és 7 expressziója.**

Szövettan (H.E., n=108)	BMP2*	BMP4	BMP5	BMP7
<b>Otosclerosis (n=51)</b>				
Aktív otosclerosis (n=39)	+++	++++	+++	+++
Inaktív otosclerosis (n=12)	-	+	-	-
<b>Nemotoszklerotikus stapes fixáció (n=16)</b>				
Annuláris kalcifikáció (n=16)	-	-	-	-
<b>Kontroll (n=41)</b>				
Kortikális csont (n=35)	-	-	-	-
Incus (n=6)	-	-	-	-

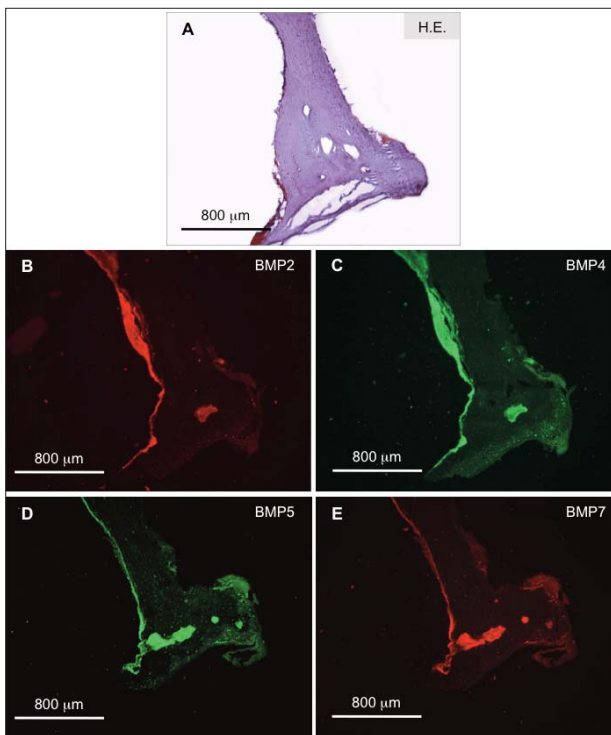
\*Az immunfluoreszcens próbák subjektív kiértékelése intenzitásuk szerint, melyek 40x-es nagyítással, 10 centrálisan fókuszált mező elemzése alapján készültek: +, gyenge gyűrűszerű immunreaktivitás; ++, gyenge homogén immunreaktivitás; +++, erős homogén vagy gyenge szemcsézett immunreaktivitás; +++++, erős konfluáló és masszív szemcsézett reakció.

**Megbeszélés**

Annak ellenére, hogy számos betegség-asszociált lókuszt térképeztek fel és kapcsolak össze az otosclerosisral, az okozó gének és azok fehérjetermékeinek azonosítása mindeközéig nem járt sikerrel (1, 6). Ráadásul a gén-asszociációs tanulmányok a COL1A1, a COL1A2 és a RELN vonatkozásában ellentmondó eredményeket generálnak (7, 11). Figyelemre méltó különbség, hogy a mi tanulmányunkkal ellentétben, az otosclerosis diagnózisa a stapes fixációs beteg anamnézisének és audiológiai leletén alapul a sebészileg eltávolított stapestalpak szövettani analízise helyett (6, 9, 11). Feltehetőleg ez a stapeditomia korlátaival magyarázható, ami nem alkalmas módszer a stapestalpak megbúvó fixációt okozó lézió kinyerésére.

A tanulmány célja az otosclerosis és nem otosclerosis stapestalpak BMP expressziójának precíz kiértékelése és összehasonlítása csontspecifikus kontrollokkal. Jelen beszámoló eredményei igen értékesek, ugyanis eddig összesen 3 tanulmány jelent meg az otosclerosis és a megnövekedett BMP expresszió lehetséges kapcsolatáról (8, 12, 16). Továbbá megerősítettük Lehnerdt és munkatársainak azon feltételezését, miszerint a BMP2, 4 és 7 kiváltó tényező az otosclerosis patogenezisében (8). Jelenlegi tudásunk szerint, ez az első tanulmány az irodalomban, amely bizonyítja a BMP5 szerepét az otosclerosis patogenezisében. Jelen közlemény indirekt módon alátámasztja azt az elképzelést, hogy a BMP2, BMP4, BMP5 és BMP7 (TGF-β szuperfamilia négy tagja) megnövekedett expressziója szerepet játszik az otoszklerotikus csontremodelling betegségben.

Úgy gondolták, hogy a különböző típusú BMP-k és BMPR-k részt vehetnek az otosclerosisban megfigyelhető patológiásan megnövekedett csontforgalomban (8, 12, 16). Úttörőként Lehnerdt és munkatársai végeztek otoszklerotikus stapestalpakban immunhisztokémiai analízist BMP-k és BMPR-k után kutatva (8). Az otoszklerotikus fókuszkokban szignifikánsan magasabb BMP2, 4 és 7 expressziót figyeltek meg a normál, nem otoszklerotikus



**3. ábra: A nem otoszklerotikus stapes fixációban a BMP expresszió immunfluoreszcens demonstrációja**

(A) A nemotoszklerotikus stapestalp annuláris kalcifikációja hipocellularitással és szögletes mellső pólussal (HE, jobb fül). Az oszteociták negatív immunreakciót mutatnak BMP2 (B), BMP4 (C), BMP5 (D) és BMP7 (E) specifikus festésre.



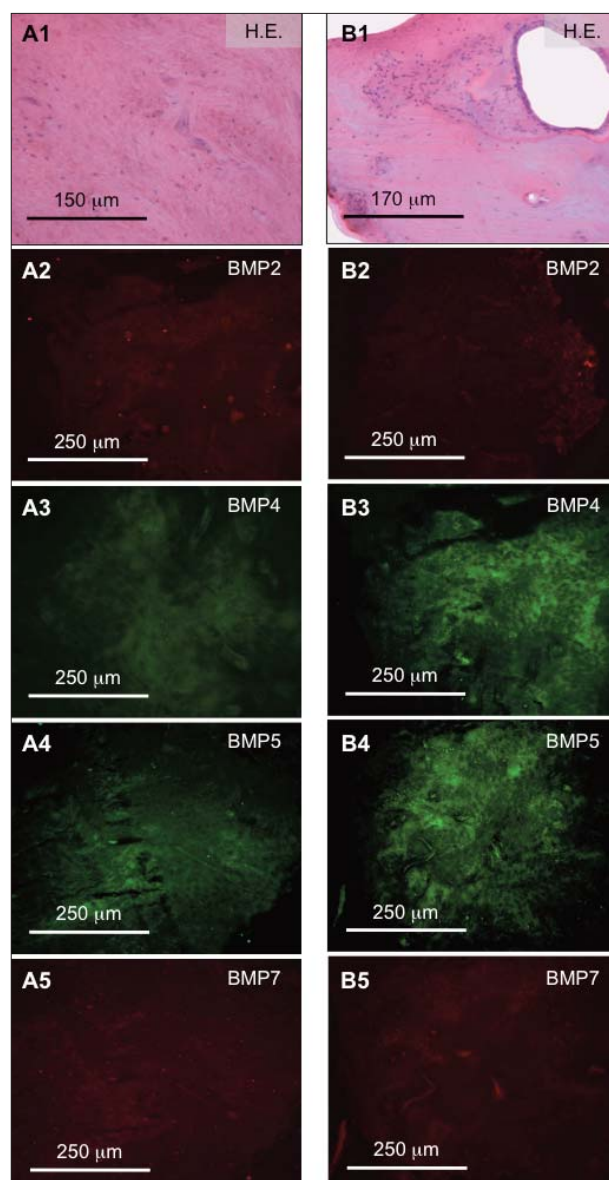
stapes mintákkal összehasonlítva (8). A BMPR-k közül a BMPR-1B és BMPR-2 fokozott, míg a BMP-1A mindig negatív immunreakciót ad (12). Így feltehetőleg a BMP-k hatása 1B és 2-es típusú BMPR-kon keresztül közvetítődik (12). Később ugyanez a kutatócsoport aktív otosklerotikus szöveteken hajtotta végre a különböző BMP izoformák immunfluoreszcens tipizálását, ekkor BMP2, 4 és 7 expressziót sikerült kimutatni (12). *Schrauwen* és *munkatársai* hívták fel a figyelmet a BMP izoformák lehetséges kockáztnövelő szerepére otosclerosisban (16). Szignifikáns összefüggést tapasztaltak a klinikai otosclerosis és a fokozott BMP2 és BMP4 expresszió között (16). A szerzők két otosclerosis-aszociált single nucleotide polimorfizmusról (SNP, egy pontos nukleotid-polimorfizmus) számoltak be a BMP2 és BMP4 génjeiben (16). Az első nem kódoló SNP rs3178250 (BMP2) a 3' nem ordítódó régióban helyezkedik el, míg a második rs17563 (BMP4) aminosav cseréhez vezet a BMP4-ben, amely szorosan összefügg otosclerosisissal (16). Ezek a megfigyelések egészen ésszerűek, mivel a csontképződésnek a BMP-k és a TGF- $\beta$  is kulcsregulátorai. Ráadásul a BMP és a TGF- $\beta$  útvonalakban számos összefonódás figyelhető meg, amelyek ellentétes kölcsönhatásokat eredményeznek a két fehérjecsoport között (17, 18).

Az otikus kapszula és a stapestalp megszokott enchondrális csontosodással fejlődik az embrionális és a posztnatális korban, azonban ez az első életév végére befejeződik (1). A csontforgalommal arányos osteoblast és osteoclast aktivitás ritkán, vagy egyáltalán nem figyelhető meg az oticus kapszulában (1, 2). Erre a jelenségre létezik potenciális magyarázat: az alacsony fokú csontanyagcsere védi a hátrányos labirintust és a Corti-féle szervert a komoly biomechanikai változásoktól az egész élet során (1, 2). Az oticus kapszula 3 csontszerű rétegből áll, az endosteális réteg közvetlen a perilymphatikus tér mellett, a globuli interossei középen – amely valójában embrionális csontmaradvány – és kívül a periosteális réteg található (1). Az oticus kapszula enchondrális rétege sajátos, embrionális kondrocitákat tartalmaz, amelyek egész életen át perzisztálnak (1, 19). A stapestalp vesztibuláris rétegében hasonló sejtek fedezhetők fel. Elképzelhető, hogy ezek a maradványok a legkorábbi otoscleroticus góccok kiindulási helyei (1, 19). Mindazonáltal, ezek a sejtek eltűnnek az otoscleroticus fókuszból, osteoclast prekurzorokkal és aktív osteoclastokkal cserélődnek ki (19). A normál felnőtt oticus kapszulával ellentétben az otoscleroticus góccok osteoclastjai és osteoblastjai speciális embrionális glikoproteint expresszálnak (CD51/61 – osteoclast funkcionális antigén) (19). Ráadásul a megnövekedett BMP-k, TGF- $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\beta$  és apoptózis inhibitorok (hCIAP1/2) expressziója is alátámasztja otosclerosisban az embrionális kondrocita reaktiváció hipotézisét (1, 8, 9, 20). Korábbi beszámolók szerint a condroblastok és az osteoblastok reaktiválódhatnak és osteoklastokká alakulhatnak a kanyaróvírus fertőzés által előidézett gyulladáshoz valószínűleg (5, 19, 20).

Befejezésül pedig az otosclerosis egy komplex csontremodelling zavarnak tekinthető, amelyet genetikai, környezeti és metabolikus faktorok egyaránt befolyásolnak. Jelenlegi és korábbi tanulmányok szerint a különböző típusú BMP-k lényeges szerepet játszanak az aktív otosclerosis korai molekuláris eseményeiben. Ezek fényében, további vizsgálatok szükségesek a BMP szerepének meghatározására az otosclerosis patofiziológiájában, hogy a későbbiek során közelebb kerülhessünk egy ígéretes gyógyszeres kezeléshez a betegség korai, aktív stádiumában.

#### Köszönetnyilvánítás

Tanulmányunk az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA PD75371, K81480) és a Debreceni Egyetem Mece-



**4. ábra: A csontspecifikus kontrollokban a BMP expresszió immunfluoreszcens demonstrációja**

(A1) Az incus teste normál szerkezetű cement vonalakat és ereket reprezentál (HE, bal fül). Az oszteociták negatív immunreakciót mutatnak BMP2 (A2), BMP4 (A3), BMP5 (A4) és BMP7 (A5) specifikus festésre.

(B1) A külső hallójárat hátsó falából származó kortikális csont fragmentum (HE, bal fül). Az oszteociták nem mutatnak detektálható expressziót BMP2 (B2), BMP4 (B3), BMP5 (B4) és BMP7 (B5) specifikus festésre.

natúra Pályázatának (DEOEC Mec 17/2008) támogatásával jött létre. Jelen közlemény másodközlés, amelyet az Informa Healthcare kiadó engedélyezett.

#### Irodalom

- Chole RA, McKenna M. Pathophysiology of otosclerosis. *Otol Neurotol* 2001; 22: 249–257.
- Stankovic KM, Adachi O, Tsuji K, et al. Differences in gene expression between the otic capsule and other bones. *Hear Res* 2010; 265: 83–89.
- Declau F, Van Spaendonck M, Timmermans JP et al. Prevalence of otosclerosis in an unselected series of temporal bones. *Otol Neurotol* 2001; 22: 596–602.
- Karosi T, Csomor P, Petkó M, et al. Histopathology of nonotosclerotic stapes fixations. *Otol Neurotol* 2009; 30: 1058–1066.
- McKenna MJ, Mills BG, Galey FR, et al. Filamentous structures morpholog-

- ically similar to viral nucleocapsids in otosclerotic lesions in two patients. *Am J Otol* 1986; 7: 25–28.
6. Van Den Bogaert K, Govaerts PJ, De Leenheer EM, et al. Otosclerosis: a genetically heterogeneous disease involving at least three different genes. *Bone* 2002; 30: 624–630.
  7. McKenna MJ, Kristiansen AG, Bartley ML, et al. Association of COL1A1 and otosclerosis: evidence for a shared genetic etiology with mild osteogenesis imperfecta. *Am J Otol* 1998; 19: 604–610.
  8. Lehnerdt G, Unkel C, Metz KA, et al. Immunohistochemical evidence of BMP-2, -4 and -7 activity in otospongiosis. *Acta Otolaryngol* 2008; 128: 13–17.
  9. Thys M, Schrauwen I, Vanderstraeten K, et al. The coding polymorphism T263I in TGF-beta1 is associated with otosclerosis in two independent populations. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 2021–2030.
  10. Karosi T, Szalmás A, Csomor P, et al. Disease-associated novel CD46 splicing variants and pathologic bone remodeling in otosclerosis. *Laryngoscope* 2008; 118: 1669–1676.
  11. Schrauwen I, Ealy M, Huentelman MJ, et al. A genome-wide analysis identifies genetic variants in the RELN gene associated with otosclerosis. *Am J Hum Genet* 2009; 84: 328–338.
  12. Lehnerdt G, Metz KA, Trelakis S, et al. Signaling by way of type IB and II bone morphogenetic protein receptors regulates bone formation in otospongiosis. *Laryngoscope* 2007; 117: 812–816.
  13. de Gorter DJ, van Dinther M, Korchymskyi O, et al. Biphasic effects of transforming growth factor  $\beta$  on bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 2011; 26: 1178–1187.
  14. Liu W, Butts S, Kim H, et al. Negative regulation of otic capsule chondrogenesis: it can make you Smad. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1116: 141–148.
  15. Brown DJ, Kim TB, Petty EM, et al. Autosomal dominant stapes ankylosis with broad thumbs and toes, hyperopia, and skeletal anomalies is caused by heterozygous nonsense and frameshift mutations in NOG, the gene encoding noggin. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 618–624.
  16. Schrauwen I, Thys M, Vanderstraeten K, et al. Association of bone morphogenetic proteins with otosclerosis. *J Bone Miner Res* 2008; 23: 507–516.
  17. Harris SE, Bonewald LF, Harris MA, et al. Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 855–863.
  18. Zheng MH, Wood DJ, Wysocki S, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances expression of interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 genes in normal human osteoblast-like cells. *J Cell Physiol* 1994; 159: 76–82.
  19. Karosi T, Jókay I, Kónya J, et al. Activated osteoclasts with CD51/61 expression in otosclerosis. *Laryngoscope* 2006; 116: 1478–1484.
  20. Csomor P, Sziklai I, Liktó B, et al. Otosclerosis: disturbed balance between cell survival and apoptosis. *Otol Neurotol* 2010; 31: 867–874.