

Debreceni Orvostudományi Egyetem Fül-Orr-Gégeklinika*

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

DOTE Patológiai Intézet** (igazgató: Prof. Dr. Gomba Szabolcs egyetemi tanár) közleménye

Apoptosis vizsgálata humán belsőfülben

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

Közlésre érkezett: 1997. 06. 29.

Kulcsszavak: apoptosis, humán belsőfül, immunhisztokémia.

ÖSSZEFOGLALÁS

Szerzők humán felnőtt és fetalis belsőfül struktúráit vizsgálták immunhisztokémiai módszerrel apoptosis kimutatása céljából. Kísérleteik során kimutatták, hogy míg a fetalis belsőfülstruktúrák magas apoptotikus aktivitással rendelkeznek, addig humán felnőtt belsőfülben nem volt apoptosis kimutatható. A proliferating cell nuclear antigen (PCNA) párhuzamos immunhisztokémiai kimutatásával információt kaptak az apoptotikus aktivitás és a sejtek proliferációs aktivitásának összefüggéséről. In vitro kísérlet során a belsőfül Aktinomycin-D-vel történt perfundálása után indukált apoptosist lehetett kimutatni. Kísérleteik során felvetik, hogy az apoptosis mechanizmusa szerepet játszik a belsőfül funkciózavarainak kialakulásában.

BEVEZETÉS

A belsőfül funkciózavaraival – a halláscsökkenéssel és a vestibuláris zavarokkal – naponta találkozunk a fül-orr-gégészeti munkánk során. Mégis köztudott, hogy adott esetben – a legrészletesebb kivizsgálás ellenére is – nehéz megállapítani a kialakult funkciózavar kiváltó okát, arról pedig még kevesebb információval rendelkezünk, hogy az igazolt vagy feltételezett etiológiai ágens milyen mechanizmus útján fejt ki hatását. A leggyakoribb etiológiai tényezők közül a hypoxiáról, vírus fertőzésről, anyagcsere zavarokról, az apoptosis kutatások során kiderült, hogy képesek apoptosis kiváltására (4, 10, 13, 16). Ez a tény, valamint az, hogy még nincsenek adatok a belsőfülben potenciálisan lejátszódó apoptotikus folyamatokról, inspirálta kutatásainkat e téma irányába.

Az apoptosis a fiziológiás sejthalál olyan speciális formája, mely határozott morfológiai és biokémiai jellegzetességei alapján tisztán elkülöníthető a sejt nekrosisától. Az apoptotikus sejt sejtfala hosszú ideig megtartja integritását, megakadályozva ezzel az elpusztult sejt alkotórészeinek – proteolitikus enzimek, toxikus anyagoknak – a sejt környezetébe való kijutását, így újabb gyulladásoz folyamat, nekrosis indukálását (1, 5, 10, 11). Az apoptosis kialakulásának jelensége időrendileg jól elkülöníthető, egymást követő morfológiailag jellemezhető fázisai vannak. Ezek a krotamin kondenzálódása, a sejtmag és cytoplazma zsugorodása, végül az úgynevezett apoptotikus testek kialakulása a cytoplazmán belül. Az apoptosis olyan fiziológiás folyamatokban szerepel, mint az emlősök szöveteinek involúciója, az embrionális fejlődés, a szövetek és szervek homeostasisának

fenntartása, az immunrendszer érése, de jelentősége van olyan patológiás állapotokban, mint az autoimmun és gyulladásos folyamatok, onkogenesis, tumor progressio, az Alzheimer-kórban észlelhető neurológiai degeneráció vagy az arteriosclerosis etiológiájában (1, 3, 6, 14, 15, 17).

Jelen vizsgálataink céljának tekintettük, hogy információt nyerjünk a humán felnőtt és fetális belsőfülben zajló apoptotikus jelenségekről, feltételezve, hogy az apoptózis szerepet játszik a belsőfül homeostasisának fenntartásában és a különböző funkciózavarral társuló patológiás történésekben.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Temporális csontminták:

22 temporális csontot távolítottunk el autopsia során 6–24 órával a halál beállta után a klasszikus Schuknecht módszerrel (12) 34–75 éves korú felnőtt betegekből (13 férfi, 9 nő). Az elhunytak kórtörténetében nem találtunk a belsőfül funkciózavarára utaló adatot. 15 beteg kardiovasculáris insufficienciában, 5 előrehaladott malignus daganatos betegségben, míg 2 beteg akut hasi történés miatt halt meg. Három beteg halálát megelőzően nagy dózisú kombinált cytostaticus kezelésben részesült.

Egy akut pancreatitisben meghalt beteg jobb oldali temporális csontját Actinomycin-D-vel perfundáltuk, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk az apoptózis indukálása céljából (4). A bal oldali belsőfület, a szokásos, korábbiakban már ismertetett módon kezeltük és kontrollként használtuk (7).

A felnőtt belsőfülekkel párhuzamosan négy, 13–15 hetes humán fetus belsőfület is tanulmányoztuk, melyek Rh-incompatibilitás illetve anyai okok miatt haltak el.

Az eltávolított csontmintákat – a fetális minták kivételével – perfundáltuk, dekalcináltuk és paraffinba ágyaztuk (7).

Apoptosis kimutatása:

Az apoptózis kimutatására, a paraffinba ágyazott metszeteket proteinase-K-val (20 µg/ml) 15 percig szobahőmérsékleten előkezeltük. Desztillált vízzel való mosás után a kimutatásra az „ApopTag-Plus in situ apoptosis detection peroxidase kit”-et használtuk (Oncor, Gaithersburg, MD) a gyártó útmutatásainak megfelelően.

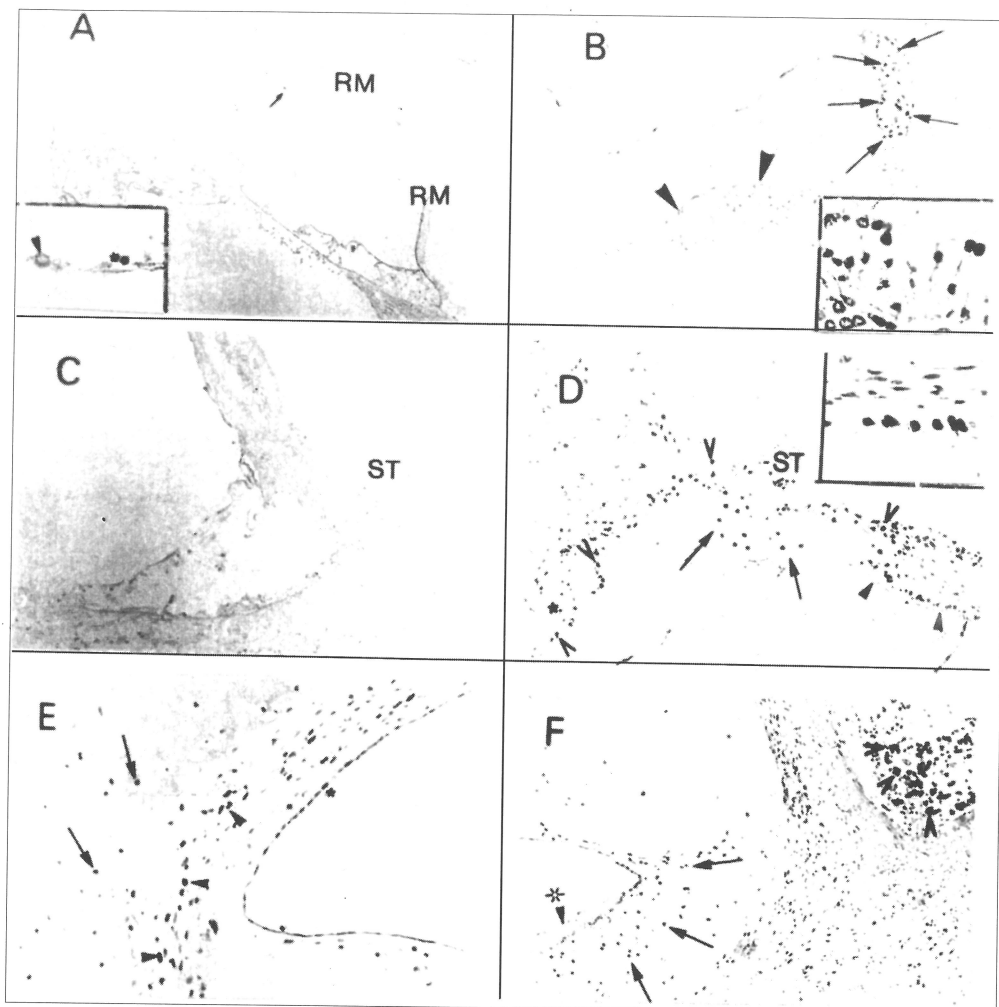
A kit az első lépésben az apoptotikus sejt fragmentálódott DNS-éhez digoxigenin-nucleotid-triphosphat komplexet köt egy enzim (terminal deoxynucleotidyl transferase) segítségével, amit peroxidase kötésben lévő anti-digoxigenin ellenanyaggal reagáltat. A reakciót 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochloride (DAB) substrát hozzáadásával teszi láthatóvá (Vector Laboratories).

A humán belsőfülben zajló proliferációs aktivitást a proliferating cell nuclear anti-gén (PCNA) immunhisztokémiai kimutatásával teszteltük.

EREDMÉNYEK

A preparált metszeteken a belsőfül cochlearis és vestibularis strukturái is jól felismerhetőek maradtak.

A felnőtt beteganyagból származott csontpreparátumok vizsgálata során az ApopTag peroxidase kit segítségével gyakorlatilag nem kaptunk pozitív festődést 17 esetben, sem a belsőfül cochleáris sem a vestibularis strukturáit illetően (1/A. ábra). Egy esetben, egy 34 éves testikularis tumorban szenvedett beteg belsőfül preparátumában sikerült apoptosist kimutatni a Corti-szerv és a stria vascularis területén (1/B. ábra). Ez a betg közvetlenül a



1/a. ábra.

Humán cochlearészlet (125X). Immunhisztokémia (Apop Tag peroxidase kit). Apoptosis gyakorlatilag nem detektálható. (Nyíl: egy apoptotikus sejt a Reissner membrán állományában. RM: Reissner membrán. Insert: Reissner membrán részlet 400X csillag: apoptotikus sejt. nyílhegy: festődést nem mutató sejt).

1/b. ábra.

Humán cochlearészlet (200X) Immunhisztokémia (Apop Tag peroxidase kit). Számos apoptotikus sejt látható a stria vascularis regiojában (nyíl) és néhány a Corti-szerv területén (nyílhegy). Insert (400X) Stria vascularis részlet, apoptozist mutató sejtek.

1/c. ábra.

Humán cochlearészlet (125X). Immunhisztokémia (Apop Tag peroxidase kit). Negatív kontroll (Aktinomycin-D-vel nem perfundált cochlea). ST: scala tympani.

1/d. ábra.

Humán cochlearészlet (200X). Immunhisztokémia (Apop Tag peroxidase kit). Aktinomycin-D-vel perfundált cochlea. Nagyfokú apoptotikus aktivitás a stria vascularis és a Corti-szerv területén. Nyíl: Corti szerv, nyílhegy: spirál limbus, csillag: stria vascularis, ST: scala tympani, nyitott nyíl: apoptotikus sejtek. Insert (400X). Apoptotikus sejtek a spirál limbus területén.

1/e. ábra.

Fetalis belsőfülrészlet (200X) Immunhisztokémia (Apop Tag peroxidase kit). Apoptotikus aktivitás a csontosodó porcszövetben és az epithelialis sejtekben. Nyíl: apoptotikus sejtek a porcszövetben, nyílhegy: apoptotikus sejtek a kötőszövetben, csillag: apoptotikus sejt az epithelialis rétegben.

1/f. ábra.

Fetalis belsőfülrészlet (125X) Immunhisztokémia PCNA. Számos festődő sejtmag a csontvelőben és a porcszövetben, ami jelzi a nagyfokú proliferációs aktivitást. Nyíl: pozitív festődés és mesenchymalis szövetekben, a csontvelőben (nyitott nyíl), a sensoriepithelialis elemekben (nyílhegy), csillag: otocysta lumene.

halálát megelőzően nagy dózisu kombinált cytostaticus terápiában részesült (cysplatin, vinblastin, bleomycin). Mivel a korábbi felnőttekből származó szövetminták esetében – beleértve a két szintén cytostatikummal kezelt beteget – sem lehetett apoptosist kimutatni, felmerült bennünk, hogy az alkalmazott módszer nem alkalmas dekalcináláson átesett és paraffinba ágyazott metszetek vizsgálatára.

Ugyanakkor, mivel az egyetlen pozitív minta egy előzetesen cytostaticummal kezelt betegből származott, úgy gondoltuk, hogy a detektált apoptosist az alkalmazott cytostaticum indukálhatta. Ebből a feltevésből kiindulva egy acut pancreatitisben meghalt beteg egyik oldali temporális csontját, a kivétel előtt egy jól ismert apoptosist indukáló ágenssel, Actinomycin-D-vel perfundáltuk, majd 4 óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ugyanezen beteg másik oldali temporális csontját kontrollként használva, a hagyományos módon preparáltuk.

Az Actinomycin-D-vel perfundált metszeteken kifejezett apoptotikus aktivitás volt detektálható (1/D. ábra), míg a kontrollként beállított metszeteken nem volt apoptosis kimutatható (1/C. ábra).

A felnőtt anyagtól eltérően kifejezett apoptotikus aktivitást észleltünk a fetális preparátumokon (1/E. ábra). Míg a felnőtt humán belsőfúlstruktúrákban immunhisztokémiailag PCNA pozitivitást nem sikerült kimutatni, addig a fetális belsőfúl magas apoptotikus aktivitása jól korrelált az e metszeteken párhuzamosan észlelt nagyfokú proliferációs aktivitást jelző PCNA pozitivitással (1/F. ábra).

MEGBESZÉLÉS

Kísérleteink fő céljának tekintettük, hogy információt nyerjünk a humán felnőtt és fetális belsőfúlben potenciálisan zajló apoptotikus folyamatokról. Feltételeztük, hogy hasonlóan más szövetek, szervek embrionális fejlődéséhez, az apoptosis szerepet játszik fiziológiás körülmények között is az osztódás folyamán keletkezett genetikailag károsodott sejtek kiküszöbölésében, illetve a már véglegesen kialakult finom sensorineurális struktúra homeostázisának fenntartásában.

Mivel irodalmi adatok szerint, bizonyos körülmények között számos exogén és endogén faktor is képes az apoptosis indukálására, úgy gondoltuk, hogy az apoptosis mechanizmusa jelentős lehet a belsőfúl funkciózavarainak pathologiai hátterében, így szerepet játszhat a presbiacusis, valamint számos eddig idiopathiásnak vélt sensorineurális halláscsökkenés kialakulásában.

Inspirált minket az a tény, hogy eddig humán vonatkozásban belsőfület érintő apoptosissra vonatkozó irodalmi adat nem áll rendelkezésre, csupán állítkésérletek adatai (9).

Kísérleteink során a vizsgált fetalis belsőfül mintákon a várakozásunknak megfelelően kifejezett apoptotikus aktivitást lehetett detektálni, ami korrelált a PCNA monoklonális ellenanyaggal vizsgált nagy proliferációs aktivitással. Ezzel szemben az általunk feldolgozott felnőtt anyagból származó belsőfül metszeteken egy minta kivételével a felhasznált metodika segítségével gyakorlatilag nem sikerült apoptosist kimutatni. Ennek valószínű magyarázata, hogy a felnőtt belsőfül mint fontos érzékszerv, magasan differenciált, stabil, megállapodott struktúra, ami mint postmitotikus rendszer éppen az állandó, jó funkció biztosító. Ebben a rendszerben kicsi annak a valószínűsége, hogy a keletkező apoptosist tetten érjük. Ennek megfelelően nem kaptunk pozitív festődést PCNA vizsgálata során.

Az egyetlen apoptosissra pozitív festődést adó belsőfül minta egy testikularis tumorban meghalt és halálát megelőzően nagy dózisu, kombinált cytostaticus kezelésben részesült betegből származott. Bár a másik két cytostaticus kezelésen átesett beteg esetében nem sikerült apoptosist kimutatni, feltételeztük, hogy az észlelt apoptosist a cytostatikum indukálhatta (8).

Ennek bizonyítására egy akut pancreatitisben meghalt beteg egyik oldali cochleáját egy jól ismert apoptosist indukáló ágenssel az actinomycin-D-vel perfundáltuk, majd 4 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk, míg a másik oldali csontminta kontrollként szolgált.

Az actinomycin-D-vel előkezelt mintákon kifejezett apoptotikus aktivitást észleltünk a Corti-szerv és a stria vascularis területén, ezzel ellentétben kontrollként használt csontminta vizsgálata során nem lehetett apoptosist kimutatni.

Eredményeink alapján újabb információkat szereztünk a humán belsőfülben zajló apoptotikus folyamatokról. Megállapíthatjuk, hogy a fetalis belsőfülben zajló kifejezett apoptotikus aktivitással szemben, a megállapodott, felnőttből származó csontmintákon csak ritka esetben lehet az apoptosist tetten érni. Az actinomycin-D-vel szerzett tapasztalatok alapján feltételezzük, hogy bizonyos endogén vagy exogén ágensek adott körülmények között képesek apoptosist indukálni a belsőfül struktúráiban is, ami magyarázatul szolgálhat az eddig idiopathiásnak tartott belsőfül funkciózavarok kialakulási mechanizmusára.

IRODALOM

1. Bowen, I. D., Bowen, S. M.: Programmed cell death in tumours and tissues. New York, Chapman and Hall (1990).
2. Chou, C. C., Lam, C. Y., Yung, B. Y.: Intracellular ATP is required for actinomycin-D-induced apoptotic cell death in HeLa cells. *Cancer Lett.* 96 (2), 181–187 (1995).
3. Cohen, J. J., Duke, R. C., Fadok, V. A., Sellins, K. S.: Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Ann. Rev. Immunol.* 10, 267–293 (1992).
4. Copin, J. C., Reola, L. F., Chan, T. Y., Epstein, C. J., Chan, P. H.: Oxygen deprivation but not a combination of oxygen, glucose and serum deprivation induces DNA degradation in mouse cortical neurons in vitro: attenuation by transgenic overexpression of CuZn-superoxide dismutase. *J. Neurotrauma* 13(5), 233–244 (1996).
5. Fésűs, L.: Biochemical events in naturally occurring forms of cell death. *Febs Lett.* 328, 1–5 (1993).
6. Han, K. M., Haudenschild, C. C., Hong, M. K., Tinkle, B. T., Leon, M. B., Liau, G.: Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am. J. Pathol.* 147, 267–277 (1995).
7. Jókay, Dezső, B., Soós, Gy., Répássy, G.: Human os temporale preparálása hisztokémiai vizsgálat céljából. *Fül-orr-gégegyógy.* 40, 219–224 (1994).
8. Kondo, S., Yin, D., Morimura, T., Takeuchi, J.: Combination therapy with cisplatin and nifedipine inducing apoptosis in multidrug-resistant human glioblastoma cells. *J. Neurosurg.* 82 (3), 469–474 (1995).
9. Li, L., Nevill, G., Forge, A.: Two modes of hair cell loss from the vestibular sensory epithelia of the guinea pig inner ear. *J. Comp. Neurol.* 355, 105–117 (1995).
10. Payne, C. M., Bernstein, H., Garewal, H.: Role of apoptosis in biology and pathology: Resistance to apoptosis in colon carcinogenesis. *Ultrastructural Pathology* 19, 221–248, (1995).
11. Saunders, Jr. J. W.: Death in embryonic systems. *Science* 154, 604–612 (1966).
12. Schuknecht, H. F.: Temporal bone removal at autopsy. *Arch. Otolaryng.* 87, 129–137 (1968).
13. Schwartzman, R. A., Cidlowski, J. A.: Mechanisms of tissue specific induction internucleosomal deoxyribonucleic acid cleavage activity and apoptosis by glucocorticoids. *Endocrinology* 133, 591–599 (1993).
14. Szende B., Lübben T., Romics

I., Vass L.: Apoptosis különböző malignitási fokú, kezeletlen és hormonkezelt prosztata rákokban. Magyar Onkológia 4, 170-173 (1996). – 15. Thompson, C. B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment disease. Science 267, 1456-1462 (1995). – 16. Tolskaya, E. A., Romanova, L. I., Kolesnikova, M. S., Ivannikova, T. A., Smirnova, E. A., Raikhlin, N. T., Ajal, V. I.: Apoptosis inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. J. Virol. 69 (2), 1181-1189 (1995). – 17. Williams, G. T.: Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. Cell 65, 1097-1098 (1991).

SUMMARY

I. Jókay, Gy. Soós, Z. Papp, B. Dezső, G. Répássy: *Examination of apoptosis in human inner ear*

The authors investigated human adult and fetal inner ear structures immunohistochemically for the purpose to detect apoptosis. They found high apoptotic activity in fetal inner ear structures with parallel positive stainings for PCNA. On the contrary there was no detectable apoptosis in the adult cochlear structures. During in vitro experiment the cochlea was perfused with Actinomycin-D, a well-known apoptosis inducer. After perfusion apoptotic activity was detected. On the base of their experiments the authors suppose the possible role of apoptosis in the mechanism of inner ear disturbance.

ZUSAMMENFASSUNG

I. Jókay, Gy. Soós, Z. Papp, B. Dezső, G. Répássy: *Apoptose-Untersuchungen des menschlichen Innenohres*

Verff. untersuchten erwachsene und foetale menschliche Innenohrstrukturen mit immun-histochemischen Methoden zum Nachweis von Apoptose. Die Versuche zeigten, dass foetale Innenohrstrukturen eine hohe apoptotische Aktivität haben, im erwachsenen Innenohr dagegen keine Apoptose nachweisbar war. Der parallel durchgeführte immunhistochemische Nachweis des Proliferating cell nuclear-Antigens (PCNA) brachte Informationen über den Zusammenhang zwischen der apoptotischen und der proliferativen Aktivität der Zellen. In vitro-Versuche konnten die Induktion zur Apoptose nach Perfusion von Actinomycin-D ins Innenohr nachweisen. Die Untersuchungen lassen vermuten, dass der Apoptose-Mechanismus eine Rolle bei Funktionsstörungen der Cochlea spielt.

Kongresszusi hírek

**A Magyar Fül-orr-gégeorvosok következő
nemzeti kongresszusa 1998. június 16-20. között lesz.**

A kongresszus helyszíne: Pécs.

A részletes értesítést mindenki személyesen megkapja.

* * *

100 éves a bronchosopia.

**A Magyar Bronchologus Egyesület Ünnepi Tudományos ülése
és a Bronchológiai Asszisztensek éves Fóruma**

1997. december 4-én 10-16 óráig lesz.

Helye: Svábhegyi Gyermekgyógyintézet Auditórium és Könyvtár.