

Mechanizmy niszczenia kości w przewlekłym zapaleniu ucha środkowego z perlakiem

Bone destruction mechanisms in chronic otitis media with cholesteatoma

EWA OLSZEWSKA^{1/}, ANDRZEJ SIĘKIEWICZ^{1/}, MAŁGORZATA BORZYM-KLUCZYK^{2/}, MAREK PYD^{3/}, HOLGER SUDHOFF^{4/}

^{1/} Klinika Otolaryngologii AM w Białymstoku

^{2/} Zakład Biochemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Białymstoku

^{3/} Oddział Laryngologii Wojewódzkiego Szpitala im. Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Łomży

^{4/} Klinika Otolaryngologii Uniwersytetu Zagłębia Rury, Bochum, Niemcy

Wprowadzenie. Przewlekłemu zapaleniu ucha środkowego z perlakiem towarzyszy proces zapalny objawiający się m.in. niszczeniem kości przylegającej do perimatrix perlaka.

Cel. Przeanalizowanie ekspresji limfocytów CD4, CD11a, CD11b, CD14, CD51, CD68 oraz TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*) w poszczególnych warstwach perlaka w porównaniu do zdrowej skóry przewodu słuchowego zewnętrznego.

Materiał i metody. Do badań użyto perlaki i wycinki zdrowej skóry przewodu słuchowego zewnętrznego pobrane podczas zabiegu operacyjnego z powodu przewlekłego zapalenia ucha środkowego z perlakiem. Zastosowano standardową metodę peroksydazową ze znakowaniem streptawidyną. Przyjęto wynik reakcji immunohistochemicznej jako negatywny, gdy nie obserwowano komórek z ekspresją badanych markerów, słabo pozytywną – mniej niż 5% komórek z ekspresją badanych białek, wyraźnie pozytywną (5-75% komórek dodatnich) oraz wysoce dodatnią >75% komórek dodatnich. Obserwacje przeprowadzono pod mikroskopem świetlnym. Do obliczeń zastosowano automatyczny system analizujący.

Wyniki. W badanych wycinkach skóry przewodu słuchowego zewnętrznego obserwowano słabo dodatnią reakcję (<5% komórek dodatnich) z przeciwciałami przeciwko CD4, CD11a, CD11b, CD51, CD68 i TRAP w tkance podnabłonkowej skóry przewodu słuchowego zewnętrznego. Natomiast w perimatrix perlaka reakcje immunohistochemiczne wykazały wysoce dodatnią reakcję (>75% komórek dodatnich).

Wnioski. Liczba limfocytów CD4, CD11a, CD11b, CD14, CD51, CD68 oraz kwaśnej fosfatazy TRAP jest wyraźnie większa w perimatrix perlaka w porównaniu do zdrowej skóry przewodu słuchowego zewnętrznego. Potwierdza to udział mechanizmu komórkowego w procesie resorpcji kości wywołanej przez stan zapalny w perlaku.

Słowa kluczowe: perlak, TRAP, mechanizmy niszczenia kości, metoda immunohistochemiczna

Introduction. Chronic otitis media with cholesteatoma is an inflammatory disease characterized by bone destruction.

Aim. To assess the expression of lymphocytes: CD4, CD 11a, CD 11b, CD14, CD51, CD68 and TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*) in cholesteatoma layers compared with normal meatal skin.

Material and methods. Cholesteatoma and normal meatal skin specimens were used for this investigation. The labeled streptavidin peroxidase method was used. The result of the immunochemical reaction was classified as negative when no cells with the expression of test markers were noted; as weakly positive – below 5% marker-expression cells (+ cells); evidently positive – (5%-75% +cells); and highly positive (>75% +cells). Tissue specimens were examined and digitally recorded using a light microscope. Automatic analysing system was used to perform those calculations.

Results. The results of immunohistochemical staining reactions with CD4, CD 11a, CD 11b, CD14, CD51, CD68 and TRAP in the subepithelial tissue of normal external meatal skin showed weakly positive reactions (<5% positive cells). Numerous infiltrating cells within the perimatrix of cholesteatoma expressed CD4, CD 11a, CD 11b, CD14, CD51, CD68 and TRAP (>75% positive cells).

Conclusions. The number of examined lymphocytes and TRAP is markedly increased in the perimatrix of cholesteatoma tissue. This observation confirms the osteoclast participation in localized inflammatory bone resorption in cholesteatoma.

Key words: cholesteatoma, TRAP, mechanism of bone destruction, immunohistochemical staining

Nadesłano: 19.09.2005

Oddano do druku: 01.06.2006

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Ewa Olszewska

Klinika Otolaryngologii AM, ul. Skłodowskiej 24 A, 15-276 Białystok
tel. (85) 746-82-69, fax (85) 746-86-97 e-mail: ewasan@wp.pl

WSTĘP

Perlak jest dość powszechną chorobą ucha, która niszczy struktury ucha środkowego i wewnętrznego prowadząc do utraty słuchu, dysfunkcji przedsionkowej oraz porażenia nerwu twarzowego. Przyczyny powstawania i rozwoju perlaka nie są do końca wyjaśnione. Potwierdziliśmy

udział enzymów proteolitycznych, angiogenezy, proliferacji i apoptozy w patogenezie perlaka [1-3]. Innym procesem, który wpływa na agresywność choroby jest resorpcja kości w miejscach przylegających do perimatrix perlaka. W wyniku resorpcji kości dochodzi do niszczenia kosteczek słuchowych, które klinicznie ujawnia się postępującym ubytkiem słuchu. Resorpcja kości skroniowej i toczący się w niej proces zapalny mogą prowadzić do poważnych powikłań śród- i wewnątrzczaszkowych. W perlaku resorpcja kości powodowana jest między innymi poprzez aktywność takich enzymów lizosomalnych, jak katepsyna D. Wzrost aktywności katepsyny D obserwowaliśmy w perimatrix perlaka przylegającej do kości [4].

Stale postępujący proces resorpcji kości jest większy w przypadku perlaka niż prostego przewlekłego zapalenia ucha środkowego. Utratę kosteczek słuchowych obserwuje się u około 80% pacjentów leczonych z powodu perlaka ucha środkowego. Natomiast u chorych z wywiadem przewlekłego zapalenia ucha środkowego bez perlaka kosteczki słuchowe były zniszczone u 10 do 20% tych pacjentów. Proces zapalny związany z perlakiem przyczynia się do wydzielania endogennych mediatorów resorpcji kości. Interleukina 1α i 1β , TNF- α i - β uaktywniają miejscowe osteoklasty [5]. Cytokiny, prostaglandyny, tlenek azotu, czynniki wzrostu w przewlekłym zapaleniu ucha środkowego z perlakiem inicjują wychwytywanie osteoklastów oraz resorpcję kości. TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) odgrywa kluczową rolę w tym procesie poprzez pobudzenie osteoblastów i stymulację resorpcji kości [6, 7].

Osteoblasty różnicują się z mezenchymalnych komórek macierzystych, a osteoklasty pochodzą z hematopoetycznych prekursorów makrofagów [8]. Osteoblasty i makrofagi mają liczne antygeny powierzchniowe. Makrofagi nie resorbują kości i wykazują ekspresję antygenów powierzchniowych CD11a, CD11b, CD14, CD68, natomiast osteoklasty wykazują ekspresję CD51 (α łańcuch receptoru witronektyny) oraz TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*) [9, 10]. Resorpcja kości jest złożonym procesem zapoczątkowanym przez wychwytywanie jednojądrowych komórek szpiku kostnego, które ostatecznie przekształcają się w osteoklasty. Komórki te są zdolne resorbować organiczne i nieorganiczne struktury kostne [11].

Celem pracy była ocena ekspresji limfocytów CD4, CD11a, CD11b, CD14, CD51, CD68 oraz TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*) w poszczególnych warstwach perlaka w porównaniu do zdrowej skóry przewodu słuchowego zewnętrznego.

MATERIAŁ I METODY

Perlaki i wycinki zdrowej skóry przewodu słuchowego zewnętrznego pobrano od szesnastu dorosłych pacjentów podczas zabiegu operacyjnego z powodu przewlekłego zapalenia ucha środkowego z perlakiem. Wiek chorych wahał się od 43 do 62 lat (średnia wieku 49,5 lat). W grupie tej było 11 mężczyzn i 5 kobiet. Pacjenci, w wywiadzie, podawali wycieki z ucha od czterech do dziewięciu lat (śr. 7,5) oraz upośledzenie słuchu. Zgłaszane choroby współistniejące nie miały znaczenia dla przebiegu choroby zasadniczej. Wziernikowo, przed zabiegami operacyjnymi obserwowaliśmy ubytek błony bębenkowej w części wiotkiej u jedenastu chorych, u trzech – w kwadrantach tylnogórnych oraz u dwóch – zniszczenie ściany tylnogórnej przewodu słuchowego zewnętrznego.

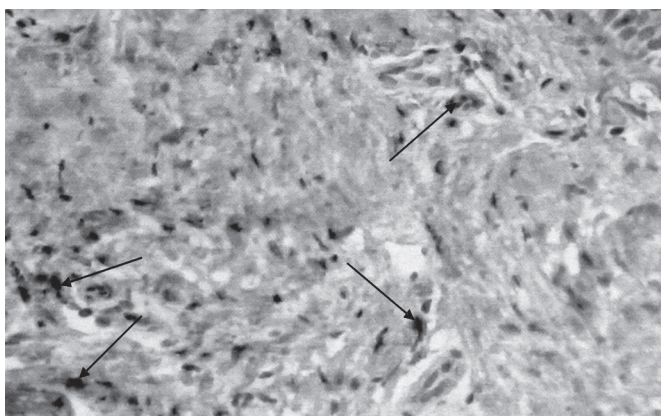
Perlaki i wycinki zdrowej skóry przewodu słuchowego zewnętrznego, po utrwaleniu w 8% zbuforowanej formalinie, zatopiono w kostki parafinowe, seryjnie pocięto na skrawki, a następnie w sposób rutynowy barwiono hematoxyliną i eozyną dla oceny procesu zapalnego.

Zastosowano standardową metodę peroksydazową znakowaną streptawidyną według Hsu i wsp. [12]. Po odparafinowaniu i odwodnieniu preparatów, 4 μ m skrawki zanurzaliśmy w 3% H₂O₂ przez 10 minut i 10% surowicy króliczej przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Skrawki inkubowaliśmy ze wstępnym przeciwciałem przeciwko antygenom CD4, CD11a, CD11b, TRAP, CD51, CD68 i CD14 w temperaturze 4°C przez 24 godziny. Stosowaliśmy monoklonalne przeciwciała mysie przeciwko antygenom CD11a, CD14, CD68, CD51 i TRAP oraz przeciwciała poliklonalne kozie przeciwko antygenom CD4 i CD11b. Następnie stosowano wtórne przeciwciała biotynylowane (Zymed Laboratories, San Francisco, USA) i inkubowano z zestawem: awidyna i peroksydaza biotynylowa przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Brązowe zabarwienie uzyskiwano stosując dwuaminobenzodynę (DAB, Camon Laboratories, Wiesbaden, Niemcy). Skrawki, w których użyto surowice wstępnie immunizowane i nie zastosowano pierwotnego przeciwciała służyły jako negatywna kontrola. Ocena intensywności barwienia immunohistochemicznego dokonana została przez dwóch niezależnych badaczy. Preparaty oceniano pod mikroskopem świetlnym. Przyjęto wynik reakcji negatywny, gdy nie obserwowano komórek z ekspresją badanych białek, słabo pozytywną – gdy mniej niż 5% komórek wykazywało ekspresję badanych markerów (komórki takie nazwano komórkami dodatnimi), wyraźnie pozytywną – gdy 5-75% komórek wykazywało reakcję dodatnią, oraz wysoce pozytywną – gdy >75% komórek było dodatnich.

Do tych obliczeń zastosowano automatyczny system analizujący (KS300, Kontron Elektronik, Köhn, Niemcy).

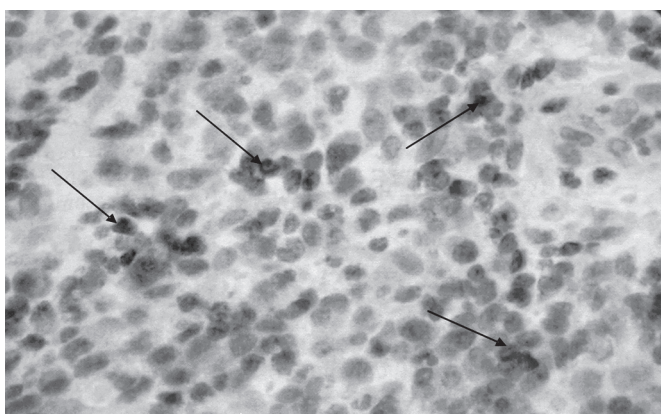
WYNIKI

We wszystkich badanych wycinkach skóry przewodu słuchowego zewnętrznego obserwowano słabo dodatnią reakcję (<5% komórek dodatnich) z przeciwciałami przeciwko CD4, CD11a, CD11b, CD51, CD68 i TRAP. Markery te zlokalizowane były w tkance podnabłonkowej.



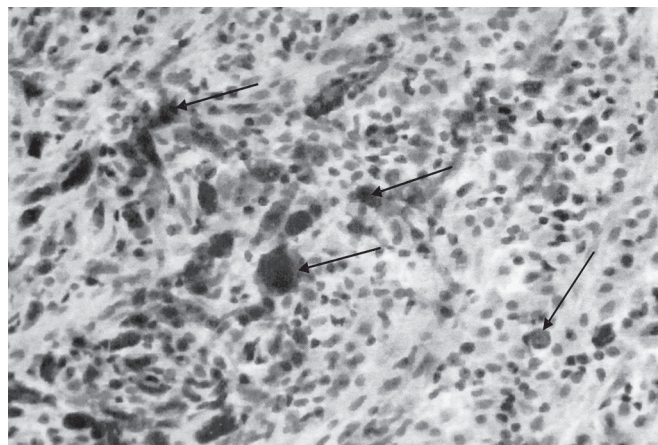
Ryc. 1. Skóra przewodu słuchowego zewnętrznego. Słabo dodatnia reakcja immunohistochemiczna z przeciwciałami przeciwko TRAP [strzałki wskazują komórki TRAP (+)]. Powiększenie x 200

Wysoce dodatnią reakcję (>75% komórek dodatnia) obserwowano z markerami CD51, CD68 i TRAP w 12 preparatach perlaka, natomiast w 4 – średnia liczba komórek dodatnich wynosiła 54,3%. Reakcje immunohistochemiczne obserwowano w perimatrix perlaka.



Ryc. 2. Perimatrix perlaka. Liczne komórki z ekspresją antygeny przeciwko TRAP. Strzałki wskazują komórki TRAP (+). Powiększenie x 200

Wyraźnie pozytywną reakcję immunohistochemiczną z przeciwciałami anti- CD4, CD11a i CD11b wykazano w 14 preparatach perlaka i wysoce dodatnią



Ryc. 3. Perlak. Wyraźnie pozytywna reakcja immunohistochemiczna z przeciwciałami anti-CD4 w perimatrix perlaka. Strzałki wskazują komórki CD4 (+). Powiększenie x 400

w 2 badanych perlakach. We wszystkich przypadkach badane markery obecne były w warstwie podnabłonkowej perlaka.

Pozytywne reakcje immunohistochemiczne z przeciwciałami przeciwko badanym antygenom obserwowano we wszystkich przypadkach zmienionej zapalnie tkanki podnabłonkowej perlaka. Intensywność barwienia była większa w obszarach wzmożonego nacieku zapalnego.

DYSKUSJA

W przewlekłym zapaleniu ucha środkowego z perlakiem dochodzi do uwolnienia czynników, takich jak: interleukina 1 α , IL-1 β , TNF- α i - β , które uaktywniają miejscowe osteoklasty [13]. Interleukina-1 obecna jest w matrix perlaka i pobudza fibroblasty i makrofagi do produkcji prostoglandyny E-2 oraz kolagenaz. Z kolei kolagenazy, poprzez pobudzenie osteoklastycznej resorpcji, wpływają na aktywność osteoklastów [14]. Osteoklasty w perimatrix perlaka pochodzą z hematopoetycznych komórek prekursorowych. Wyniki naszego badania dotyczące ekspresji antygenów CD4, CD11a, CD11b, CD14 i CD68 wykazały nasilenie komórek prekursorowych osteoklastów i makrofagów w perimatrix perlaka w porównaniu do skóry przewodu słuchowego zewnętrznego. Odgrywają one znaczącą rolę w zapoczątkowaniu procesu niszczenia kości. Wydaje się, że komórki te biorą również udział w immunologicznej odpowiedzi organizmu na keratynocyty w obrębie ucha środkowego [15]. Wyniki te zgodne są z doniesieniami Chole i wsp. Autorzy obserwowali liczne makrofagi oraz limfocyty T w tkance perlaka [16]. Aktywowane limfocyty T mogą zapoczątkowywać osteoklastogenezę i osteoklastyczną resorpcję kości w perlaku i innych chorobach powodujących destrukcję kości [17]. Wzmoczoną immunoreaktywność obserwowano w obszarach wyraźniejszego nacieku zapalnego w tkance podnabłonkowej

perlaka. Nie obserwowano istotnych różnic pomiędzy perlakami pobranymi od pacjentów z krótszym i dłuższym wywiadem choroby. Podobnie nie obserwowano istotnej różnicy w ocenie intensywności barwienia immunohistochemicznego w perlakach pobranych od dwóch pacjentów ze zniszczeniem tylnego-górnego przewodu słuchowego zewnętrznego. W barwieniu hematoksyliną i eozyną obserwowano niewielką ilość aktywnych osteoklastów w obszarze perimatrix. Wiąże się to prawdopodobnie z tym, że zabieg operacyjny przeprowadza się najczęściej w późnym okresie stanu przewlekłego, co pozostaje w zgodzie z doniesieniami Cynamon i wsp. [18]. Zbyt mała grupa nie pozwala na wykazanie statystycznych różnic pomiędzy intensywnością reakcji immunohistochemicznych z badanymi antygenami a klinicznymi cechami choroby. Negri i wsp. wykazali również wysoką aktywność makrofagów i limfocytów T w perlaku [19]. Watt przedstawił mechanizm odpowiedzi keratynocytów na stan zapalny naskórka przewodu słuchowego zewnętrznego lub błony bębenkowej. Zgodnie z jego wynikami badania keratynocyty migrują, proliferują i różnicują się prowadząc do kumulacji reszt keratynowych i tworzenia się perlaka. Keratynocyty warstwy podstawnej proliferują, a następnie przesuwają się w kierunku warstw powierzchniowych [20]. Białko w gromadzących się resztach keratyny jest rozpoznawane i pochłaniane przez makrofagi [21]. Iino i wsp. sugerują, że zaktywowane makrofagi wspomagane są przez limfokiny, które z kolei produkowane są przez limfocyty T. Aktywne makrofagi wytwarzają różne enzymy hydrolityczne i cytokiny w miejscu stanu zapalnego. Następnie mogą one przyczyniać się w sposób pośredni do resorpcji kości [22]. Cynamon i wsp. wykazali, że powierzchnia kości, do której przylega perlak jest nierówna z ubytkami w periosteum [18].

Zwiększona reaktywność immunohistochemiczna markerów CD51 i TRAP w naszym badaniu była wynikiem zwiększonego ujawnienia się komórek olbrzymich

i mononuklearnych. Ponieważ wielojądrzastość komórki nie jest wiarygodnym kryterium identyfikacji osteoklastów, komórki z ekspresją przeciwciał przeciwko antygenowi CD51 i TRAP mogą przypuszczalnie być zaliczone do formacji osteoklastów. TRAP jest podstawowym białkiem, które wykazuje wysoką aktywność fosfoprotein i ATP. Ten izoenzym wykryto m.in. w makrofagach, osteoklastach, wątrobie i śledzionie [23-25]. TRAP i katepsyna K są głównymi enzymami odpowiedzialnymi za degradację macierzy kostnej [26]. CD51 należy do rodziny receptorów, która rozpoznaje sekwencję Arg-Gly-Asp. Antygen ten znajduje się na wielu komórkach m.in. neutrofilach, makrofagach, monocytach, melanocytach i osteoklastach [27]. Natomiast wzrost ekspresji w linii komórek prekursorowych osteoblastów i makrofagów w perlaku tj. CD4, CD11a, CD11b, CD14, CD68 odgrywa decydującą rolę w immunologicznej inicjacji resorpcji kości.

Wyjaśnienie związku pomiędzy czynnikami zapalnymi i biorącymi udział w procesie osteoklastogenezy może wnieść nowe spojrzenie w patogenetyczne mechanizmy resorpcji kości indukowanej przez perlak. Wyodrębnienie kolejnych czynników patogenetycznych w procesie niszczenia kości przez perlak a w szczególności czynników prognostycznych może ostatecznie przynieść wymierne korzyści w procesie prewencji terapii chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z perlakiem.

WNIOSKI

Liczba limfocytów CD4, CD11a, CD11b, CD14, CD51, CD68 oraz kwaśnej fosfatazy TRAP jest wyraźnie większa w perimatrix perlaka w porównaniu do zdrowej skóry przewodu słuchowego zewnętrznego. Potwierdza to udział mechanizmu komórkowego w procesie resorpcji kości wywołanej przez stan zapalny w perlaku.

Piśmiennictwo

1. Olszewska E, Chodynicky S, Chyczewski L. Proliferacja i apoptoza w nabłonku perlaka u dorosłych. *Otolaryngol Pol* 2003; 57(1): 85-89.
2. Olszewska E, Chodynicky S, Chyczewski L. Znaczenie angiogenezy w patogenezie perlaka ucha środkowego u dorosłych. *Otolaryngol Pol* 2004; 58(3): 559-563.
3. Olszewska E, Lautermann J, Koc C, Schab M, Dazert S, Hildmann H, Sudhoff H. Cytokeratin expression pattern in congenital and acquired pediatric cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005; 262: 731-736.
4. Chodynicky S, Chyczewski L, Olszewska E. Immunohistochemical investigations of cathepsin D activity in the structures of cholesteatoma. *Med Sci Monit* 2002; 8(5): BR184-186.
5. Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL, Ago JM. Synergic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol* 1987; 138(5): 1464-1468.
6. Akimoto R, Pawankar R, Yagi T, Baba S. Acquired and congenital cholesteatoma: determination of tumor necrosis factor-alpha, intercellular adhesion molecule-1, interleukin-1-alpha and lymphocyte functional antigen-1 in the inflammatory process. *ORL* 2000; 62: 257-265.
7. Jung JY, Chole RA. Bone resorption in chronic otitis media: the role of the osteoclast. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2002; 64: 95-107.
8. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504-1508.
9. Greenfield EM, Bi Y, Miyauchi A. Regulation of osteoclast activity. *Life Sci* 1999; 65: 1087-1102.

10. Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 1999; 27: 1229-1241.
11. Amling M, Delling G. Zellbiologie des Osteoklasten und molekulare Mechanismen der Knochenresorption. *Pathologie* 1996; 17: 358-367.
12. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immuno-peroxidase techniques. A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580.
13. Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR, Roodman GD. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulates the formation of human osteoclast like cells in vitro. *J Bone Min Res* 1989; 4(1): 113-118.
14. Ahn J, Huang CC, Abramson M. Interleukin 1 causing bone destruction in middle ear cholesteatoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1990; 103: 527-534.
15. van Dijk CM, Visser CE, Veldman JE. Spatial distribution of Langerhans' cells and T-lymphocyte subpopulations in human tympanic membrane and aural cholesteatoma. *Virchows Arch B* 1986; 52: 143-152.
16. Chole RA. Osteoclasts in chronic otitis media, cholesteatoma, and otosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1988; 97: 661-666.
17. Quinn J, McGee J, Athanasou N. Human tumour-associated macrophages differentiate into osteoclastic bone-resorbing cells. *J Pathol* 1998; 184: 31-36.
18. Cinamon U, Kronenberg J, Benayahu D. Structural changes and protein expression in the mastoid bone adjacent to cholesteatoma. *Laryngoscope* 2000; 110: 1198-1203.
19. Negri B, Schilling V, Bujia J, Schultz P, Kastenbauer E. Immunotype findings in macrophages in aural cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1992; 249(2): 87-90.
20. Watt FM. Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr Opin Cell Biol* 1989; 1: 1107-1115.
21. Iino Y, Toriyama M, Ogawa H, Kawakami M. Cholesteatoma debris as an activator of human monocytes. Potentiation of the production of tumor necrosis factor. *Acta Otolaryngol* 1990; 110(5-6): 410-415.
22. Iino Y, Toriyama M, Ohmi S, Kanegasaki S. Activation of peritoneal macrophages with human cholesteatoma debris and α -keratin. *Acta Otolaryngol* 1990; 109(5-6): 444-449.
23. Halleen J, Hentunen TA, Hellman J, Vaananen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase from human bone: purification and development of an immunoassay. *J Bone Miner Res* 1996; 11(10): 1444-1452.
24. Fleckenstein E, Dirks W, Dehmel U, Drexler HG. Cloning and characterization of the human tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) gene. *Leukemia* 1996; 10(4): 637-643.
25. Fleckenstein E, Dirks WG, Drexler HG. The human tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP): involvement of the hemin responsive elements (HRE) in transcriptional regulation. *Leuk Lymphoma* 2000; 36(5-6): 603-612.
26. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337-342.
27. Suzuki S, Argraves WS, Pytela R, Arai H, Krusius T, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. cDNA and amino acid sequences of the cell adhesion protein receptor recognizing vitronectin reveal a transmembrane domain and homologies with other adhesion protein receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83(22): 8614-8618.