



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI  
MEDICINSKI FAKULTET



**Dalibor Vranješ**

**ZNAČAJ EKSPRESIJE MEDIJATORA  
INFLAMACIJE KOD HOLESTEATOMA  
SREDNJEG UHA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2020.



UNIVERSITY OF BANJA LUKA  
FACULTY OF MEDICINE



**Dalibor Vranješ**

**THE SIGNIFICANCE OF INFLAMMATORY  
MEDIATORS EXPRESSION IN MIDDLE  
EAR CHOLESTEATOMA**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2020.

**MENTOR:**

Prof. dr sc. med. Slobodan Spremo,  
redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

.....

**ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:**

Prof. dr sc. med. Radoslav Gajanin, predsjednik,  
redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

.....

Prof. dr sc. med. Slobodan Spremo, član,  
redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

.....

Prof. dr sc. med. Vojko Đukić, član,  
redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

.....

Prof. dr sc. med. Mirjana Gnjadić, rezervni član,  
vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

.....

Datum odbrane

**MENTOR:** Prof. dr sc. med. Slobodan Spremo, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

## **ZNAČAJ EKSPRESIJE MEDIJATORA INFLAMACIJE KOD HOLESTEATOMA SREDNJEG UHA**

### **REZIME:**

**Uvod:** Glavnu karakteristiku holesteatoma srednjeg uha čini progresivni rast s destrukcijom okolnih koštanih struktura i potencijalnim nastankom po život opasnih komplikacija. Cilj istraživanja je bio da se ispitaju i uporede nivoi ekspresije faktora nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukina-1 (IL-1) i matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) u ćelijama perimatriksa stečenog holesteatoma i inflamirane sluznice srednjeg uha. Takođe su ispitani nivoi ekspresije pomenutih imunohistohemijskih pokazatelja s određenim mikromorfološkim i kliničkim parametrima.

**Metode:** Istraživanje predstavlja retrospektivno-prospektivnu studiju, kojom je obuhvaćeno 178 ispitanika oba pola, operativno tretiranih zbog hronične upale srednjeg uha tokom petogodišnjeg perioda. Ispitanici su kategorisani u dvije grupe na osnovu prisustva ili odsustva stečenog holesteatoma srednjeg uha: 97 (eksperimentalna) i 81 (kontrolna). Uzorci perimatriksa holesteatoma ( $n=97$ ) i inflamirane sluznice srednjeg uha ( $n=81$ ) su intraoperativno uzeti od ispitanika tokom mikrohirurške procedure. Nivoi ekspresije receptora faktora nekroze tumora-alfa 2 (TNF-R2), IL-1 i MMP-9 su ispitani imunohistohemijskom analizom intraoperativno dobijenih tkivnih uzoraka.

**Rezultati:** Visokopozitivna ekspresija TNF-R2 i MMP-9 pokazuje statistički značajno veću učestalost u ćelijama perimatriksa stečenog holesteatoma u odnosu na kontrolno tkivo inflamirane sluznice srednjeg uha gdje je visoko pozitivna ekspresija IL-1 statistički značajno učestalija. Visokopozitivna ekspresija TNF-R2 i IL-1 pokazuje statistički značajnu učestalost kod difuzno proširenog i holesteatoma lokalizovanog u području atika, antruma i/ili mastoidnog nastavka. Holesteatom i visokopozitivna ekspresija IL-1 i MMP-9 imaju statistički značajnu predikciju prisustva ivičnog tipa perforacije membrane timpani, a negativna ekspresija MMP-9 centralnog tipa. Holesteatom i visokopozitivna ekspresija IL-1 su statistički značajni prediktori prisustva atik i zadnjeg-ivičnog podtipa, a negativna i slabo pozitivna ekspresija MMP-9 atik podtipa perforacije membrane timpani. Holesteatom i visokopozitivna ekspresija TNF-R2, IL-1 i MMP-9 su statistički značajni prediktori prisustva hiperstrofične sluznice i granulacija u kavumu timpani. Prisustvo holesteatoma i teži stepen koštane destrukcije kod ispitanika s hroničnom upalom srednjeg uha su statistički značajno povezani.

Stepen ekspresije TNF-R2 i IL-1 u tkivu holesteatoma ima statistički značajnu predikciju za nastanak koštane destrukcije u odnosu na kontrolno tkivo inflamirane sluznice srednjeg uha. Holesteatom i stepen ekspresije pojedinih imunohistohemijskih pokazatelja su statistički značajno povezani s određenim kliničkim parametrima (dob, pol, antibiotska terapija, mikrobiološki nalaz brisa uha, palatinalne tonzile).

**Zaključak:** Stepen ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 može biti značajan prediktor u razvoju kliničke slike holesteatoma i ukazivati na njegovo agresivno osteodestruktivno ponašanje s potencijalnim razvojem otogenih komplikacija. Medijatori inflamacije mogu imati značajan doprinos u evaluaciji i terapiji holesteatoma i hronične upale srednjeg uha, što ukazuje na potrebu sprovođenja daljih istraživanja.

**Ključne riječi:** holesteatom, faktor nekroze tumora-alfa, interleukin-1, matriks metaloproteinaza 9

**Naučna oblast:** Otorinolaringologija

**Naučno polje:** Medicina

**Klasifikaciona oznaka prema CERIF šifrarniku za naučnu oblast:** B610

**Tip odabrane licence Kreativne zajednice:** Autorstvo - nekomercijalno (CC BY-NC)

**SUPERVISOR:** Professor Slobodan Spremo, Full professor, Faculty of Medicine, University of Banja Luka

## **THE SIGNIFICANCE OF INFLAMMATORY MEDIATORS EXPRESSION IN MIDDLE EAR CHOLESTEATOMA**

### **SUMMARY:**

**Objectives:** The main characteristic of middle ear cholesteatoma is progressive growth with destruction of the surrounding bone structures and potential occurrence of life-threatening complications. The main objective of the study was to examine and compare the levels of expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1) and matrix metalloproteinase 9 matrix (MMP-9) in perimatrix cells of acquired cholesteatoma as well as middle ear inflamed mucosa. The expression levels of the mentioned immunohistochemical parameters with certain micromorphological and clinical parameters were also examined.

**Methods:** The research is a retrospective-prospective study, which included 178 subjects of both sexes, who underwent surgical treatment for Chronic otitis media (COM) over a five-year period. The subjects were categorized into two groups based on the presence or absence of acquired cholesteatoma of middle ear: 97 (Experimental) and 81 (Control). Samples of the perimatrix of cholesteatoma (n=97) and inflamed middle ear mucosa (n=81) were collected intraoperatively. Expression levels of tumor necrosis factor receptor 2 (TNF-R2), IL-1 and MMP-9 were determined by immunohistochemical analysis of intraoperatively obtained tissue samples.

**Results:** A highly positive expression of TNF-R2 and MMP-9 shows a statistically significantly higher frequency in the cholesteatoma perimatrix compared to control tissue of inflamed middle ear mucosa where highly positive IL-1 expression is statistically significantly more frequent. A highly positive expression of TNF-R2 and IL-1 shows a statistically significant frequency in diffusely enlarged and cholesteatoma localized in the area of the attic, antrum and/or mastoid process. Cholesteatoma and highly positive expression of IL-1 and MMP-9 are statistically significant predictors of the presence of the marginal type of tympanic membrane perforation (MT), and negative expression of MMP-9 of the central type. Cholesteatoma and highly positive expression of IL-1 are statistically significant predictors of the presence of attic and posterior-marginal subtype, and negative and weakly positive expression of MMP-9 attic subtype of MT perforation. Cholesteatoma and highly positive expression of TNF-R2, IL-1 and MMP-9 are statistically significant predictors of the presence

of hypertrophic mucosa and granulation in the tympanic cavity. The presence of cholesteatoma and a higher degree of bone destruction in subjects with COM were statistically significantly associated. The degree of expression of TNF-R2 and IL-1 in cholesteatoma tissue has a statistically significant effect on the occurrence of bone destruction in relation to the control tissue of inflamed middle ear mucosa. Cholesteatoma and the degree of expression of certain immunohistochemical parametres are statistically significantly associated with certain clinical parameters (age, sex, antibiotic therapy, microbiological findings of ear swabs, palatine tonsils).

**Conclusion:** Expression levels of TNF-R2, IL-1 and MMP-9 can be a significant predictor in the development of the clinical presentation of cholesteatoma and indicate its aggressive osteodestructive behavior with the potential development of otogenic complications. Inflammatory mediators can make a significant contribution to evaluation and treatment of cholesteatoma of middle ear and COM, indicating the need for further research.

**Keywords:** cholesteatoma, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, matrix metalloproteinase 9

**Scientific area:** Medicine

**Scientific field:** Otorhinolaryngology

**Classification CERIF mark:** B610

**Types of creative commons license:** Authorship – noncommercial (CC BY-NC)

## **ZAHVALNICA**

*Najiskrenije se zahvaljujem mentoru, prof. dr sc. med. Slobodanu Spremi za nesebičnu podršku, iskazanu kooperativnost, stručne i naučne sugestije tokom izrade doktorske disertacije.*

*Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr sc. med. Radoslavu Gajaninu za neprocjenjivu pomoć i podršku, kao i kolektivu Klinike za bolesti uha, grla i nosa i Zavoda za kliničku patologiju Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske, Banja Luka.*

*Doktorsku disertaciju posvećujem svojim roditeljima, majci Gospi (1944-2019) i ocu Borivoju (1941-1996).*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	1
1.1. Predmet istraživanja .....	1
1.2. Definicija i istorijat .....	2
1.3. Epidemiologija holesteatoma srednjeg uha.....	3
1.4. Klasifikacija holesteatoma srednjeg uha .....	4
1.4.1. Etiološka klasifikacija holesteatoma.....	4
1.4.2. Hirurška klasifikacija stečenog holesteatoma srednjeg uha .....	4
1.4.3. Klasifikacija holesteatoma Evropske akademije za otologiju i neurootologiju i Japanskog otološkog udruženja. ....	7
1.5. Anatomske karakteristike srednjeg uha .....	10
1.5.1. Timpanička dijafragma i suženja.....	12
1.6. Patohistološke karakteristike stečenog holesteatoma srednjeg uha .....	13
1.7. Etiopatogeneza stečenog holesteatoma srednjeg uha.....	14
1.7.1. Patogeneza atik holesteatoma.....	16
1.7.2. Patogeneza sinus holesteatoma.....	16
1.7.3. Patogeneza tensa retrakcionog holesteatoma.....	16
1.7.4. Osteodestruktivne karakteristike holesteatoma .....	17
1.7.5. Mikromorfološki i imunološki aspekti .....	18
1.7.6. Medijatori inflamacije i holesteatom srednjeg uha.....	20
1.7.7. Vaskularni aspekti .....	27
1.7.8. Mikrobiološki faktori.....	27
1.7.9. Medijatori inflamacije i sekundarni limfni organi.....	28
1.8. Klinička slika i dijagnoza holesteatoma srednjeg uha .....	28
1.8.1. Klinička slika holesteatoma srednjeg uha.....	28
1.8.2. Dijagnoza holesteatoma srednjeg uha .....	29
1.9. Terapija holesteatoma srednjeg uha.....	33
1.9.1. Konzervativna terapija holesteatoma srednjeg uha .....	33
1.9.2. Hirurška terapija holesteatoma srednjeg uha.....	33
1.10. Komplikacije holesteatoma srednjeg uha .....	34
1.11. Prognoza holesteatoma srednjeg uha .....	35
<b>2. HIPOTEZA RADA .....</b>	36
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	37
<b>4. MATERIJAL I METODE.....</b>	38
4.1. Materijal.....	38
4.1.1. Ispitanici i mjesto ispitivanja.....	38
4.1.2. Selekcija ispitanika .....	38
4.2. Metode rada .....	39
4.2.1. Instrumenti mjerena.....	39
4.3. Etički aspekti.....	46

4.4.	Statistička analiza i prikaz podataka .....	46
<b>5.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>47</b>
5.1.	Medijatori inflamacije i demografske karakteristike ispitanika.....	47
5.1.1.	Starosna dob ispitanika .....	47
5.1.2.	Polna struktura ispitanika .....	53
5.2.	Medijatori inflamacije i simptomi hronične upale srednjeg uha.....	55
5.2.1.	Otalgija .....	55
5.2.2.	Sekrecija iz uha.....	56
5.2.3.	Oslabljen sluh .....	56
5.2.4.	Tinitus.....	57
5.2.5.	Vrtoglavica .....	57
5.2.6.	Glavobolja .....	59
5.3.	Medijatori inflamacije prema vremenskom intervalu: pojava prvih simptoma bolesti - postavljanje dijagnoze .....	61
5.4.	Medijatori inflamacije prema vremenskom intervalu: dijagnoza bolesti - hirurško liječenje.....	62
5.5.	Medijatori inflamacije i istorija bolesti hronične upale srednjeg uha .....	62
5.6.	Medijatori inflamacije i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha .....	63
5.7.	Medijatori inflamacije i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha; unilateralno i bilateralno .....	65
5.8.	Medijatori inflamacije i otogene komplikacije hronične upale srednjeg uha ...	67
5.9.	Medijatori inflamacije i antibiotska terapija .....	68
5.9.1.	Upotreba antibiotske terapije .....	68
5.9.2.	Vrsta antibiotske terapije .....	69
5.9.3.	Vremensko ordiniranje antibiotske terapije .....	71
5.10.	Medijatori inflamacije i patomorfološke promjene srednjeg uha .....	73
5.10.1.	Perforacija membrane timpani.....	73
5.10.2.	Tip perforacije membrane timpani .....	76
5.10.3.	Podtip perforacije membrane timpani .....	78
5.10.4.	Retrakcija membrane timpani.....	80
5.10.5.	Destrukcija koštanih zidova zvukovoda i kavuma timpani .....	82
5.10.6.	Destrukcija osikularnog lanca.....	85
5.10.7.	Sluznica kavuma timpani.....	87
5.10.8.	Status timpanalnog ušća Eustahijeve tube .....	90
5.11.	Imunohistohemijske karakteristike holesteatoma srednjeg uha.....	92
5.11.1.	Holesteatom srednjeg uha i ekspresija medijatora inflamacije.....	92
5.11.2.	Tip holesteatoma.....	97
5.11.3.	Lokalizacija i proširenost holesteatoma.....	100
5.12.	Medijatori inflamacije i rezultati mikrobiološkog ispitivanja.....	103
5.12.1.	Mikrobiološki nalaz brisa uha na biogram i antibiogram .....	103
5.12.2.	Vrsta izolovanog bakteriološkog uzročnika .....	105
5.13.	Medijatori inflamacije i rezultati audiološkog ispitivanja .....	106

5.13.1. Preoperativni i postoperativni prosječni prag sluha i vazdušno-koštani gep .....	106
5.13.2. Udio ispitanika s postoperativnim prosječnim pragom sluha ispod 40 dB.....	108
5.13.3. Postoperativno poboljšanje prosječnog praga sluha veće od 15dB ....	108
5.13.4. Postoperativno poboljšanje sluha s vazdušno-koštanim gepom ispod 20 dB .....	109
5.13.5. Preoperativni stepen oštećenja sluha .....	113
5.13.6. Postoperativni stepen oštećenja sluha.....	114
5.14. Medijatori inflamacije i kliničke karakteristike palatinalnih tonzila .....	115
5.14.1. Orofaringoskopski nalaz palatinalnih tonzila .....	115
5.14.2. Tip hroničnog tonsilitisa.....	116
5.14.3. Veličina palatinalnih tonzila .....	117
<b>6. DISKUSIJA.....</b>	<b>119</b>
<b>7. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>138</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>140</b>
<b>9. PRILOZI .....</b>	<b>155</b>

# **1. UVOD**

## **1.1. Predmet istraživanja**

Holesteatom srednjeg uha još uvijek predstavlja značajan medicinski i socioekonomski problem u svijetu, uprkos relativno niskom nivou prosječne godišnje incidence od 3 na 100.000 kod dječje i 9,2 na 100.000 kod odrasle populacije [1]. Zbog svoje sposobnosti da uzrokuje eroziju kosti, koja je prisutna u 80% slučajeva, holesteatom je najčešći uzrok nastanka otogenih egzokranijalnih i endokranijalnih komplikacija, koje su odgovorne za visoku stopu morbiditeta i mortaliteta [2,3]. Brojne sekvele i komplikacije, poput trajne slušne oštećenosti, poremećaja ravnoteže, neurološkog i psihoorganskog deficit-a, kao i naruženosti, generišu trajni invaliditet, koji u značajnoj mjeri umanjuje opštu životnu i profesionalnu aktivnost bolesnika.

Iako je klinička slika holesteatoma srednjeg uha najčešće karakteristična, bolesnici često budu hirurški liječeni u odmakloj fazi bolesti zbog mnogobrojnih faktora, kao što su: socioekonomski, tip bolesti, stepen razvijenosti i dostupnost zdravstvene službe i mogućnosti hirurškog liječenja. Uprkos hirurškoj terapiji, rizik od recidiva holesteatoma srednjeg uha i pojave postoperativnih komplikacija je visok, dok rana detekcija ostaje najvažniji prediktor za pozitivnu prognozu oboljenja [4].

Centralno mjesto u kompleksnim etiopatogenetskim mehanizmima nastanka holesteatoma srednjeg uha zauzimaju medijatori inflamacije, čija je uloga još predmet brojnih naučnih istraživanja [5]. Uloga i značaj ekspresije faktora nekroze tumora alfa, interleukina 1 i matriks metaloproteinaze 9 kod stečenog holesteatoma srednjeg uha u našoj zemlji, ali i u regionu, do sada nisu ispitivani, zbog čega ovo istraživanje može dati poseban naučni doprinos u boljem sagledavanju i sticanju novih saznanja o imunopatogenetskim, mikromorfološkim i kliničkim karakteristikama oboljenja. Takođe će biti ukazano na veću mogućnost djelovanja kako na interventnom polju dijagnostike i terapije, tako i na polju prevencije sekvela i komplikacija.

Pregledom dostupne domaće i strane literature i pretraživanjem naučnih baza podataka, nisu pronađene posebno brojne studije koje su ispitivale sličnu problematiku. Poseban značaj se ogleda i u činjenici da je višegodišnje istraživanje zasnovano na relativno velikom uzorku ispitanika s holesteatom srednjeg uha, za razliku od većine dostupnih

studija u svijetu, čime se dobijaju pouzdanije statističke analize. Rezultati ovog istraživanja mogu imati značajan doprinos za sticanje novih naučnih saznanja o holesteatomu srednjeg uha, koristiće budućim naučnim istraživanjima i kliničkim doktorima u svakodnevnom radu.

## 1.2. Definicija i istorijat

Hronična upala srednjeg uha ili hronični otitis media (HOM) je hronična upalna bolest srednjeg uha i mastoidnog nastavka koja se često manifestuje s djelimičnim ili potpunim gubitkom membrane timpani i slušnih koščica, dovodeći do konduktivnog oštećenja sluha sa stepenom težine i do 60-70 dB [6]. Bolest ima podmukao i asimptomatski početak, spor i dugotrajan tok i velika potencijalna destruktivna dejstva, naročito u prisustvu holesteatoma. Karakteristična simptomatologija uključuje: sekreciju i bol u uhu, nagluvost, šumove ili zujanje u uhu, vrtoglavicu, a ponekad i glavobolju.

Holesteatom (sin. *Cholesteatosis, Epidermosis, Keratosis*) se definiše kao cistična, ekspanzivna lezija temporalne kosti, koja se sastoji iz višeslojnog pločastog epitela s deskvamiranim keratinom, čiju glavnu osobinu karakteriše progresivan rast s destrukcijom okolne kosti zbog efekta pritiska i aktivacije osteoklasta [7, 8].

*Du Verney* je među prvima (1683. godine) opisao holesteatom kao masu sličnu tumoru, lokalizovanu između velikog i malog mozga i nazvao je "steatoma" [9]. Francuski patolog *Cruveilhier* (1829. godine), definiše holesteatom kao "*tumeur perleé*" ili perla tumor temporalne kosti. Autor prvi detaljno opisuje holesteatom kao nevaskularni tumor, porijekлом iz ćelija subarahnoidalnog prostora [10]. Termin "*holesteatom*" je prvi uveo njemački fiziolog *Johannes Müller* 1838. godine, identificujući slojeviti perla tumor u uhu s prisustvom masti i holesterina između ćelija i karakterističnom koncentričnom prstenastom akumulacijom keratina [7]. *Luchae* kasnije (1885. godine), opisujući holesteatom iza intaktne membrane timpani, vjerovatno među prvima otkriva kongenitalni tip ovog oboljenja [11]. Termin holesteatom se smatra pogrešnim s obzirom na to da se ne radi o pravom tumoru, već o pseudotumoru koji ne sadrži uvijek holesterin niti masno tkivo. Ostali nazivi poput "*perla tumor*", "*margaritoma*" ili "*keratoma*" nisu našli svoju šиру upotrebu [1]. *Schuknecht* (1974. godine) je definisao holesteatom kao akumulaciju eksfolirajućeg keratina unutar srednjeg uha ili bilo kojeg pneumatisiranog područja temporalne kosti, koji potiče iz keratinizovanog skvamoznog epitela. Autor takođe navodi da bi holesteatom mogao da bude okarakterisan kao "*koža na pogrešnom mjestu*" [12].

### **1.3. Epidemiologija holesteatoma srednjeg uha**

Provedene su brojne studije s ciljem ispitivanja incidence, dobne uslovjenosti, kao i uticaja socioekonomskih faktora na pojavu holesteatoma. Većina epidemioloških istraživanja su bila usmjerena na utvrđivanje incidence stečenog holesteatoma, za razliku od kongenitalnog, koja se u većini objavljenih studija kreće od 1-5%. Tačna incidenca stečenog holesteatoma je nepoznata. Retrospektivni statistički podaci ukazuju da prosječna godišnja incidenca iznosi 9,2 na 100.000 stanovnika kod svih dobnih skupina (raspon od 3,7 do 13,9 godina). U studijama limitiranim na dječji uzrast, incidenca se aproksimativno kreće od 5 do 15 na 100.000 djece [13]. *Harker* i saradnici, sproveđeni studiju incidence holestetatoma na godišnjem nivou u populaciji Sjedinjenih Američkih Država, tokom sedamdesetih godina prošlog vijeka, pronalaze učestalost od 6 holesteatoma na 100.000 stanovnika [14].

Tokom osamdesetih godina prošlog vijeka *Ruben* i saradnici utvrđuju učestalost od 4,2 novootkrivena holesteatoma na 100.000 stanovnika na godišnjem nivou u populaciji Sjedinjenih Američkih Država [15]. *Manolidis* i *Georgopopoulos* sa saradnicima, sproveđeni epidemiološku studiju incidence i prevalence holesteatoma od 1960. do 1987. godine u populaciji Grčke, utvrđuju jednaku zastupljenost holesteatoma u odnosu na različite socioekonomiske faktore [16].

Škotski autor *Padgham* i saradnici, tokom perioda od 1966. do 1986. godine, pronalaze incidencu holesteatoma od 13 na 100.000 stanovnika [17]. Finski autor *Kempainen* i saradnici, tokom devedesetih godina prošlog vijeka, pronalaze da starosni interval učestalosti holesteatoma na godišnjem nivou iznosi 3,7-13,9 s prosječnom vrijednošću od 9,2. Autori utvrđuju statistički značajno veću incidencu holesteatoma kod pripadnika muškog pola mlađih od 50 godina, dok isti nivo značajnosti ne pronalaze kod pripadnika nižih socijalnih slojeva [1]. *Toš* je tokom 16-godišnje studije pronašao da godišnja incidenca stečenog holesteatoma iznosi 3 na 100.000 kod dječje i 9,2 na 100.000 kod odrasle populacije s predominacijom muškog pola [18].

Većina istraživanja upućuje na veću učestalost holesteatoma kod pripadnika muškog pola. Studija sprovedena u Engleskoj od 2006. do 2016. godine ukazuje da je učestalost holesteatoma kod pripadnika muškog pola iznosila 52,7%, dok su rezultati drugog istraživanja iz perioda od 2014. do 2015. godine pokazala iznos od 59,4% [19]. *Khalid-Raja* i saradnici navode da je broj operacija holesteatoma srednjeg uha veći u područjima s višim indeksom materijalne deprivacije [20].

## **1.4. Klasifikacija holesteatoma srednjeg uha**

### **1.4.1. Etiološka klasifikacija holesteatoma**

Prema etiologiji nastanka holesteatoma, izvršena je opšta klasifikacija na kongenitalni i stečeni tip. *Kongenitalni holesteatom* nastaje od ostataka embrionalnog tkiva, koje je od embriogeneze zaostalo ili u koštanom tkivu temporalne kosti ili u bilo kojoj njegovoj šupljini. Osim najtipičnije lokalizacije u srednjem uhu, ektopični holesteatom je pronađen u petroznoj kosti, spoljašnjem slušnom kanalu, paranazalnim šupljinama, endokranijumu, posebno u pontocerebelarnom uglu i urogenitalnom traktu. Opisani su slučajevi obostranog kongenitalnog holesteatoma koji može biti udružen s anomalijama osikularnog lanca ili u sklopu "*branhio-oto-renalnog sindroma*" [21-28].

*Persaud* i saradnici definišu kongenitalni holesteatom kao perzistentnu fetalnu epidermoidnu formaciju, dok za nastanak stečenog holesteatoma tvrde da su odgovorni različiti mehanizmi: imigracija epitela, bazalna hiperplazija, prisustvo retrakcionog džepa i /ili traume membrane timpani (jatrogene ili nejatrogene) [29]. *Stečeni holesteatom*, prema tipu etiopatogenetskog mehanizma nastanka, se dijeli na primarni i sekundarni o čemu će detaljnije biti riječi u poglavljju Etiopatogeneza holesteatoma.

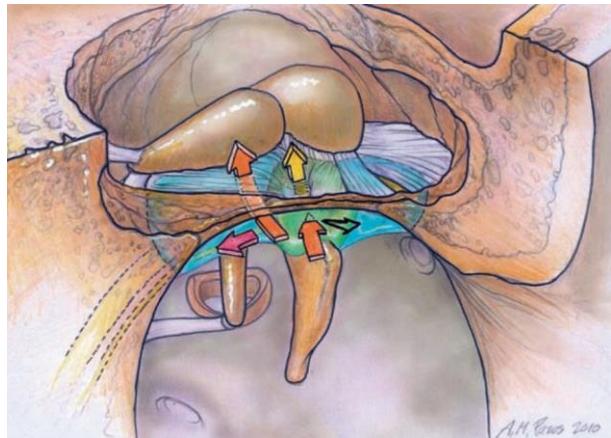
### **1.4.2. Hirurška klasifikacija stečenog holesteatoma srednjeg uha**

Hirurška klasifikacija stečenog holesteatoma u odnosu na primarnu lokalizaciju i pravce širenja izvršena je na sljedeće anatomske regije [30]:

a) Atik ili epitimpanički holesteatom, koji se dodatno klasificuje na:

- *lateralni atik holesteatom* (involvira samo *Prusak*-ov prostor),
- *zadnji atik holesteatom* (raste medijalno prema inkusu i involvira zadnji atik i mastoid),
- *prednji atik holesteatom* (raste anteriorno prema glavi maleusa).

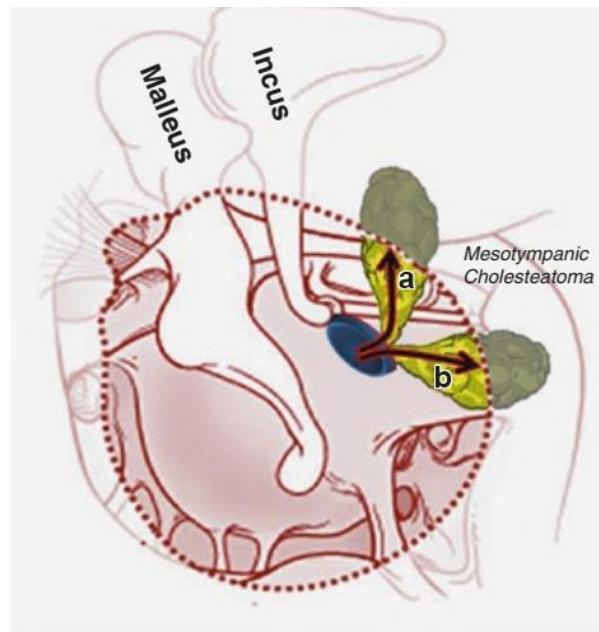
Atik holesteatom inicijalno nastaje iz retrakcije ili perforacije u području *Shrapnell*-ove membrane, primarno se širi u atik i involvira tijela maleusa i inkusa. Može da se širi put naprijed u *recessus epitympanicus* i prema timpanalnom ušću Eustahijeve tube ili nazad prema aditusu, a potom i antrumu mastoida (Slika 1) [31-33].



**Slika 1.** Atik holesteatom u inicijalnom stadijumu, ograničen na Prussak-ov prostor (kratka narandžasta strelica), proširen u zadnji atik (crvena strelica), gornji atik (zelena strelica), proširen prema gore preko defekta bubne opne (duga narandžasta strelica) ili kroz prošireni dio Prussak-ovog prostora (žuta strelica) do lateralnog malearnog prostora, odakle su otvoreni svi pravci širenja [30].

- b) **Mezotimpanički holesteatom**, koji nastaje iz pars tensa membrane timpani, raste medijalno duž lenticularnog nastavka i suprastruktura stapesa. Širi se gore prema zadnjem atiku ili nazad u sinus timpani, a može da involvira kompletan kavum timpani [30]. Sudhoff i Tos su mezotimpanički holestetatom dodatno klasifikovali na [34]:
- **Sinus holesteatom** (retrakcija postero-superiornog kvadranta membrane timpani, koja ispunjava sinus timpani),
  - **Tensa holesteatom** (difuzna retrakcija membrane timpani u prostor srednjeg uha).

Sinus holesteatom inicijalno nastaje u području postero-superiorne retrakcije ili perforacije pars tensa membrane timpani i primarno se širi u sinus timpani, postero-superiorni retrotimpanon, potom ispod inkusa u atik ili aditus ad antrum i duž suprastrukture stapesa u nišu ovalnog prozora. Dalja propagacija sinusa holesteatoma može da se odvija u tri pravca: nazad prema antrumu mastoida i mastoidnim celijama, gore prema zadnjem atiku, pri čemu dolazi u kontakt sa tijelom inkusa i maleusom, i prema dolje u retrotimpanon i hipotimpanon. Sinus holesteatom ne involvira prednji dio kavuma timpani. Jedna trećina sinus holesteatoma je lokalizovana samo u kavumu timpani i njima se može pristupiti transkanalnim putem bez mastoidektomije (Slika 2) [31-33].



*Slika 2.* Šematski prikaz širenja sinus holesteatoma u recessus facialis i sinus timpani (**a**) i atik kroz zadnji timpanični istmus (**b**) [35].

Tensa ili retrakcioni holesteatom se primarno lokalizuje u području kompletno retrahovane ili adherirane *pars tensa* membrane timpani. Primarno se širi u mezotimpanon, prema timpanalnom ušću Eustahijeve tube i pneumatskim ćelijama hipotimpanona. Dalje širenje se može nastaviti prema prednjem atiku, retrotimpanonu, antrumu i pneumatskim ćelijama mastoida. Toš je izvršio dodatnu klasifikaciju na *sinus holesteatom pars tensa* i *tensa holesteatome* koji potiču iz prednjeg, zadnjeg i donjeg kvadranta membrane timpani (Slika 3) [31-33].



*Slika 3.* Šematski prikaz tensa holesteatoma; inicijalni rast u području pars tensa i može da se širi na donji lateralni atik i preko timpaničkog istmusa do svih gornjih kompartmana atika [30].

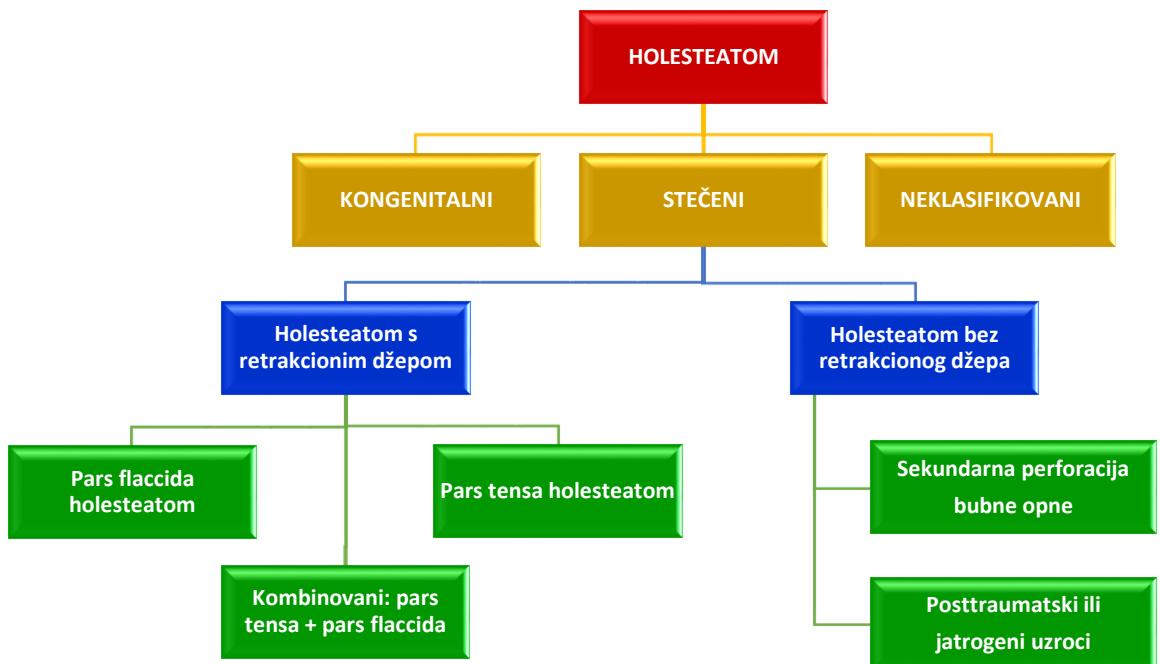
- c) **Holotimpanički holesteatom**, koji uključuje atik, mezotimpanon i mastoid. To su atik holesteatomi, prošireni u prostor mezotimpanona ili mezotimpanički holesteatomi, prošireni u prostor atika.
- d) **Kongenitalni holesteatom**, koji obično u području anterosuperiornog kvadranta membrane timpani adherira uz tetivu *m.tensor tympani* i *procesus cochleariformis*, ali se može širiti u svim smjerovima.
- e) **Neklasifikovani holesteatom**, nepoznate primarne lokalizacije ili rezultat progresivnog rasta dva retrakciona džepa. Širi se izvan različitih anatomske kompartmana, uključujući mezotimpanon, atik i mastoid.

Prema stepenu proširenosti, stečeni holesteatom se dodatno klasificuje na sljedeće anatomske regije: *atik i antrum, kompletno srednje uho, mastoidni nastavak, Eustahijevu tubu, labirint i srednju lobanjsku jamu* [37].

#### **1.4.3. Klasifikacija holesteatoma Evropske akademije za otologiju i neurootologiju i Japanskog otološkog udruženja**

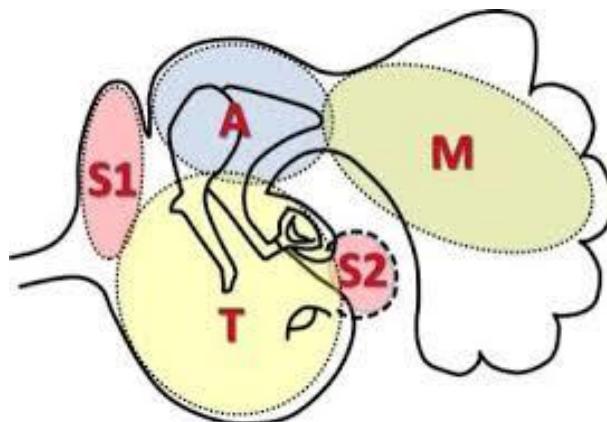
Zasnovana je na konsenzusu Evropske akademije za otologiju i neurootologiju i Japanskog otološkog udruženja (eng. EAONO/JOS - *The European Academy of Otology and Neurootology / Japan Otological Society*) iz 2016. godine. Klasifikacija holesteatoma je izvršena na tri glavne kategorije sa subkategorijama (Slika 4) [38]:

- a) *kongenitalni tip* - specifičan za dječji uzrast,
- b) *stečeni tip* - odnosi se na dječiji uzrast i odraslu populaciju,
- c) *neklasifikovani tip* - holesteatom čije se porijeklo ne može precizno utvrditi.



*Slika 4. Klasifikacija i gradacija stečenog holesteatoma srednjeg uha: zasnovano na konsenzusu Evropske akademije za otologiju i neurootologiju i Japanskog otološkog udruženja, 2016. godina [38].*

Kako bi se pojednostavio prikaz proširenosti holesteatoma, prostor srednjeg uha i mastoidnog nastavka je podijeljen na četiri kompartmana (Slika 5).



*Slika 5. Kompartmani srednjeg uha (STAM sistem): teško pristupačna mjesta (S), kavum timpani (T), atik (A) i mastoid (M). Teško pristupačna mjesta (S) uključuju: S1 - supratubarni recesus, koji se naziva i prednji epitimpanon ili protimpanon i S2 - sinus timpani. Zadnju granicu atika čini zadnji dio kratkog nastavka inkusa ili fossa incudis, dok mastoidni nastavak uključuje antrum i mastoidne ćelije [38].*

"EAONO/JOS staging sistem" se primjenjuje na četiri kategorije holesteatoma srednjeg uha: *pars flaccida*, *pars tensa*, *kongenitalni* i holesteatom koji je *sekundarni u odnosu na tensa perforaciju* [38]:

- a) I stadijum - *holesteatom lokalizovan na primarnoj lokaciji*: pars flaccida, pars tensa, kongenitalni i holesteatom koji je sekundarni u odnosu na tensa perforaciju,
- b) II stadijum: *holesteatom koji involvira u dva ili više mesta*,
- c) III stadijum: *holesteatom s ekstrakranijalnim komplikacijama ili patološkim stanjima*:
  - paraliza facijalnog nerva, fistula na labirintu s rizicima oštećenja membranoznog labirinta, labirintitis, retroaurikularni apses ili fistula, apses zigomatične regije i vrata, destrukcija više od 1/2 dužine koštanog zida spoljašnjeg slušnog kanala, destrukcija tegmena koja zahtijeva hirurški tretman i adhezivni otitis s totalnom adhezijom u području pars tensa,
- d) IV stadijum: *holesteatom s intrakranijalnim komplikacijama*:
  - purulentni meningitis, epiduralni i subduralni apses, cerebralni apses, tromboza sinusa i hernijacija mozga u mastoidni kavitet.

Holesteatomi koji nastaju postoperativno, uslovno se mogu smatrati četvrtom kategorijom. Ova kategorija može nastati kao rezidualna ili rekurentna lezija, mada se one međusobno ne isključuju. *Rezidualni* holesteatom nastaje kao posljedica nepotpunog hirurškog uklanjanja matriksa holesteatoma, dok je *rekurentni* holesteatom rezultat reformacije retrakcionog džepa nakon prethodne potpune hirurške ekskizije [38].

Prema tipu holesteatoma, izvršena je sljedeća gradacija [38]:

Atik (*pars flaccida*) holesteatom:

- a) I stadijum: *holesteatom lokalizovan u atiku*,
- b) II stadijum: *holesteatom koji se širi iz atika i involvira dvije ili više anatomske regije (mezotimpanon, antrum, mastoid)*,
- c) III stadijum: *holesteatom s ekstrakranijalnim komplikacijama*,
- d) IV stadijum: *holesteatom s intrakranijalnim komplikacijama*.

Pars tensa holesteatom, sekundarni u odnosu na tensa perforaciju i kongenitalni holesteatom:

- a) I stadijum: *holesteatom lokalizovan u kavumu timpani*,
- b) II stadijum: *holesteatom koji se širi iz kavuma timpani i involvira dvije ili više anatomske regije (atik, antrum, mastoid)*,
- c) III stadijum: *holesteatom s ekstrakranijalnim komplikacijama*,
- d) IV stadijum: *holesteatom s intrakranijalnim komplikacijama*.

## 1.5. Anatomske karakteristike srednjeg uha

Srednje uho je nepravilan vazdušni prostor u temporalnoj kosti čiju centralnu šupljinu čini koštano-membranozna šupljina označena terminom kavum timpani (*cavum tympani*), čija prosječna zapremina iznosi  $0,8 \text{ cm}^3$ . Nalazi se medijalno od bubne opne (*membrana tympani*), a lateralno od labirintnog zida koji je odvaja od unutrašnjeg uha. Prema naprijed komunicira s Eustahijevom tubom, a prema nazad s antrumom mastoidnog nastavka. Anatomsko-topografska podjela kavuma timpani ima bitan značaj u otološkoj patologiji, pri opisu oboljenja, kao i kod hirurških intervencija u ovoj regiji. Ovaj prostor je podijeljen u četiri regije [39]:

- a) *Epitimpanon* ili *atik* - koji se nalazi iznad gornje ivice bubne opne i u njemu se nalaze glava maleusa, tijelo inkusa i njihove veze,
- b) *Mezotimpanon* - nalazi se medijalno od bubne opne i koštanog timpaničnog anulusa,
- c) *Protimpanon* - čini posterolateralnu trećinu koštanog dijela Eustahijeve tube,
- d) *Hipotimpanon* - nalazi se ispod ravni donje ivice kavuma timpani.

Kavum timpani ograničava šest zidova: lateralni ili opnasti (*paries membranaceus*), unutrašnji ili labirintni (*paries labyrinthicus*), prednji ili karotidni (*paries caroticus*), zadnji ili mastoidni (*paries mastoideus*), gornji ili pokrovni (*paries tegmentalis*) i donji ili jugularni zid (*paries jugularis*). Lateralni zid kavuma timpani najčešće dijelom čini bubna opna, a znatno manji dio tanka koštana lamela ili "mur de la logette" po francuskim autorima. Na bubnoj opni se nalaze centralno udubljenje (*umbo*), čekićna pruga (*stria mallearis*), čekićno ispupčenje (*prominentia mallei*), prednja i zadnja granična pruga (*stria anterior et posterior*). Nezategnuti dio (*pars flaccida*) ili Schrapnell-ova membrana je manji, trouglasti i znatno tanji dio bubne opne koji čini lateralnu granicu gornjeg recesusa bubne opne ili Prussak-ovog prostora, gdje se često razvija holesteatom. Zategnuti dio (*pars tensa*) je donji, veći i deblji dio bubne opne koji je svojom zadebljanom obodnom ivicom (*anulus tympanicus*) pričvršćen u timpaničnom žlijebu (*sulcus tympanicus*). Donji dio bubne opne je građen od tri sloja: epidermalnog, fibroznog i mukoznog, dok je gornji, kojem nedostaje srednji ili fibrozni sloj, dvoslojne građe [39, 40].

Na unutrašnjem zidu se nalaze sljedeće strukture: promontorijum (*promontorium*), jamica ovalnog prozora (*fossula fenestrae vestibuli*) na čijem se dnu nalazi ovalni prozor (*fenestra vestibuli*), koji je zatvoren bazalnom pločom stapesa, jamica okruglog prozora (*fossula fenestrae cochleae*) na čijem se dnu nalazi okrugli prozor (*fenestra cochleae*), koji

je zatvoren sekundarnom ili bubnom membranom (*membrana tympani secundaria*), ispučenje facijalnog kanala (*prominentia canalis facialis*), kašikasti nastavak (*processus cochleariformis*) i ispučenje lateralnog polukružnog kanala (*prominentia canalis semicircularis lateralis*) [39, 40].

Kod hroničnih otitisa, patološki proces (granulacije, holesteatom, timpanoskleroza) se često lokalizuje u predjelu niše ovalnog prozora i lako širi u susjedne recesuse. Sekundarna membrana je jedina mekotkivna struktura koja dijeli srednje od unutrašnjeg uha i ponaša se kao semipermeabilna membrana čime se objašnjavaju interakcijski procesi između srednjeg i unutrašnjeg uha kod različitih patoloških procesa [39, 41]. Na prednjem ili karotidnom zidu se nalaze sljedeće strukture: timpanalni otvor Eustahijeve tube (*ostium tympanicum tubae auditivae*), ispučenje karotidnog kanala (*prominentia carotica*) i Glaser-ova protimpanična pukotina (*fissura petrotympanica*). Na zadnjem ili mastoidnom zidu kavuma timpani se nalaze: ulaz u mastoidnu pećinu (*aditus ad antrum*), jamica za kratki krak inkusa (*fossa incudis*), piridalno ispučenje (*eminentia pyramidalis*), hordalno ispučenje (*eminentia chordalis*) kroz čiji otvor izlazi bubna vrpca (*chorda tympani*) i pruža se u bubnu duplju. Bubni sinus (*sinus tympani*) je koštano udubljenje koje se nalazi na medijalnom zidu zadnjeg dijela mezotimpanuma, medijalno od piridalne eminencije i često je zahvaćen patološkim procesom, koji se intraoperativno ne može precizno prikazati [39].

Facijalni recesus (*recessus facialis*) se nalazi na zadnjem zidu kavuma timpani, lateralno od mastoidnog dijela facijalnog kanala. Na medijalnom zidu recesusa facijalni kanal može biti dehiscentan tako da facijalni nerv protrudira u lumen sinusa. Facijalni recesus je potencijalno mjesto za lokalizaciju patološkog procesa kod hroničnog otitisa (holesteatom, granulacije). Timpanički istmus (*isthmus tympanicus*) predstavlja komunikacioni otvor između gornjeg i srednjeg dijela kavuma timpani i vrlo je značajna i anatomska kritična struktura za aeraciju i drenažu srednjeg uha, čija opstrukcija dovodi do razvoja perzistentne infekcije u atiku i mastoidu [39, 40].

Gornji zid kavuma timpani gradi tanka horizontalna lamela, zvana bubni krov (*tegmen tympani*), koji ga dijeli od srednje lobanske jame. Kod 2% ljudi je dehiscentan, što omogućava neposredni kontakt sluznice srednjeg uha s durom srednje lobanske jame. Epitimpanični sinus (*sinus epitympanicus*) je koštano udubljenje, locirano neposredno ispred prednjeg zida epitimpanona, često zatvoren sluzničnim naborom, gdje je teško uočiti patološki proces. Hiptimpanon ima važnu ulogu u patologiji i hirurgiji hroničnih otitisa jer patološki procesi (holesteatom, granulacije) lako zatvaraju ovaj prostor što uzrokuje opstrukciju i stalno održavanje inflamacije [39-41].

Osnovni sadržaj kavuma timpani, koji je obložen sluznicom i ispunjen vazduhom, čine tri slušne koščice (*osseous auditus*), mišići slušnih koščica (*m.stapedius*, *m.tensor tympani*) i bubna vrpca (*chorda tympani*). Čekić (*malleus*), nakovanj (*incus*) i uzengija (*stapes*) su međusobno zglobljeni i vezama pričvršćeni za zidove kavuma timpani i služe za transmisiju zvučne energije od bubne opne do unutrašnjeg uha. Slušne koščice pokreću dva mišića, stapedijalni (*m.stapedius*) i mišić zatezač bubne opne (*m.tensor tympani*), čijom se kontrakcijom smanjuje pokretljivost osikularnog lanca, a time i njegova sposobnost provođenja zvučne energije, djelujući kao zaštitni mehanizam od jakih zvučnih podražaja [40].

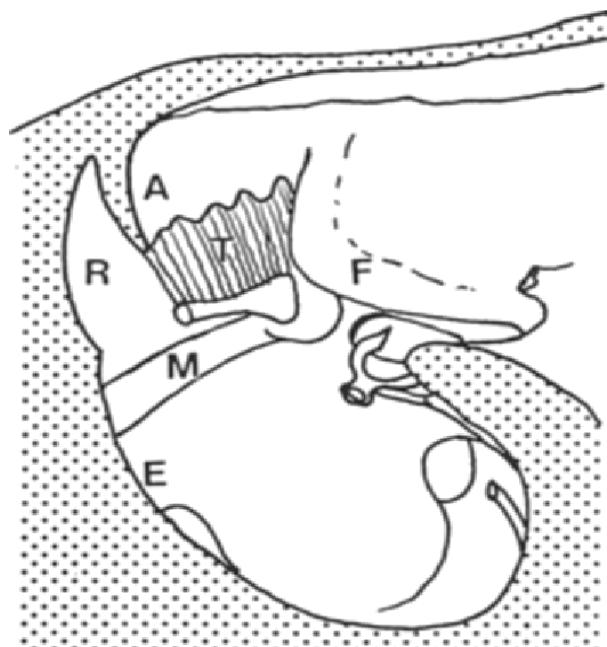
Pneumatski prostori temporalne kosti se sastoje od niza nepravilnih i međusobno povezanih šupljina od kojih jedinu stalnu ćeliju tog sistema čini antrum, koji se nalazi neposredno iza i iznad kavuma timpani i s kojim komunicira preko *aditus ad antrum-a*. Klinički je taj sistem značajan zbog mogućnosti širenja upalnog procesa preko njegovih prostora na facijalni nerv, sigmoidni sinus, područje piramide i na moždane ovojnice [40, 41].

Eustahijeva tuba (*tuba auditiva*) je kanal putem kojeg je kavum timpani u komunikaciji sa nazofarinksom, prosječne dužine 35 mm kod odraslih. Sastoji se od koštanog i hrskavičnog dijela. Lateralni, manji koštani dio polazi od prednjeg zida timpanalnog kavuma i na mjestu suženja (*isthmus tubae auditivae*) prelazi u veći, medijalni hrskavični dio. Hrskavični dio tube se nastavlja do ulaza u nazofarinks gdje formira elevaciju (*torus tubarius*) iznad kojeg se nalazi *recessus pharyngicus* (*fossa Rosenmüller*). Otvaranje tube je aktivan proces i dešava se pri žvakanju i gutanju sinergističkim djelovanjem *m. tensor veli palatini* i *m. salpingopharyngeus*. Najbitnija funkcija Eustahijeve tube je regulacija pritiska u srednjem uhu uz istovremeno zatvaranje i odvajanje kavuma timpani od prostora epifarinka, odnosno izjednačavanje vazdušnog pritiska s obje strane bubne opne [39-41].

### 1.5.1. Timpanička dijafragma i suženja

Timpanička dijafragma se definiše kao pregrada između mezotimpanona i epitimpanona, čiju strukturu čini koštana ploča i brojni sluznični nabori s otvorom. U normalnom srednjem uhu uglavnom se sastoji od sluzničnih nabora i označena je kao membranozna timpanička dijafragma, dok je kod holesteatoma prisutna velika koštana ploča bez prolaza i definiše se kao koštana timpanička dijafragma. Timpanička dijafragma se prostire horizontalno od nabora mukoznog tkiva *m.tensoris tympani* do tetine *m.stapedius-a*. Na njoj se nalazi otvor dijametra 2,5 mm, koji je *Wullstein* nazvao "drugim uskim grlom" u prostoru srednjeg uha,

dok je Eustahijeva tuba imenovana kao "prvo usko grlo". Proctor je dokazao da pod atika ili timpaničku dijafragmu čine glava i vrat maleusa, tijelo i kratki krak inkusa, prednji malearni ligament, lateralni i medijalni inkudijalni nabor, nabor *m.tensoris tympani*, a ponekad *plica m.stapedius-a* i *membrana obturatoria*. Na timpaničkoj dijafragmi se nalaze dva mala otvora: prednje timpaničko suženje (*isthmus*) između tetive *m.tensoris tympani* i stapesa te zadnje timpaničko suženje, između medijalnog inkudijalnog nabora i zadnje strane membrane timpani (Slika 6) [42-44].

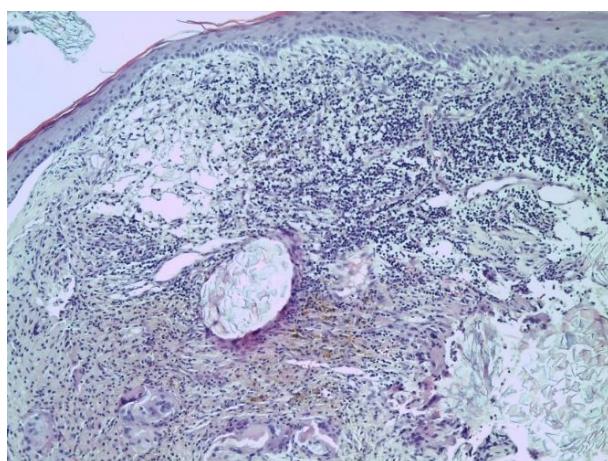


**Slika 6.** Ilustracija timpaničke dijafragme i timpaničkog istmusa: A - koštana ploča u prednjem atiku; T - mukozni nabor tenzora timpani; R - supratubalno udubljenje; M - mišić tenzora timpani; E - otvor Eustahijeve tube; F - facijalni živac [44].

## 1.6. Patohistološke karakteristike stečenog holesteatoma srednjeg uha

Patohistološku dijagnozu stečenog holesteatoma karakteriše kombinacija keratinoznog materijala i višeslojnog pločastog epitelja, čije se prisustvo u srednjem uhu smatra abnormalnim. Holesteatom se sastoji od *matriksa* koji čini pločasto-slojeviti epitel s orožavanjem, identičan s epidermisom kože, *perimatriksa ili strome* koji sadrži subepitelno granulaciono tkivo i centralne cistične mase keratina. Matriks holesteatoma se sastoji iz nekoliko slojeva: *stratum basale* - jednoredni sloj cilindričnih ćelija, *stratum spinosum* - više redova poliedričnih ćelija, povezanih međućelijskim mostićima, *stratum granulosum* - dva do četiri reda spljoštenih ćelija, bogatih keratohijalinskim zrncima, i *stratum corneum* - više redova orožalih ćelija (*keratinocita*), bez jedra, ispunjenih keratinom. Najpovršnije ćelije ovog sloja se stalno ljušte i otpadaju. Spoljašnji sloj čini perimatriks ili *lamina propria*

(stroma), subepitelno inflamatorno vezivno tkivo (*granulaciono tkivo*) koje sadrži kolagena vlakna, fibrocite i inflamatorne ćelije poput limfocita, histiocita, plazmocita i neutrofilnih leukocita. Mogu biti prisutne džinovske ćelije kao reakcija na keratinozni materijal. Centralnu komponentu holesteatoma čini cistični sadržaj s obilnim prisustvom bezjedarnih mrtvih ćelija pločastog keratina koji daju lisnati i biserno-bjeličasti otoskopski izgled holesteatoma. Često su prisutni sebum, nekrotični i/ili purulentni sadržaj. Za razliku od epidermisa kože, pločasti epitel ne sadrži adneksne strukture niti gredice (Slika 7) [30, 45-47].



*Slika 7. Histopatologija stečenog holesteatoma srednjeg uha; centralna masa keratina (cistični sadržaj) okružena tankim slojem pločasto slojevitog epitela (matriks) i vezivnim tkivom s upalnim infiltratom (perimatriks) (HE × 40).*

## **1.7. Etiopatogeneza stečenog holesteatoma srednjeg uha**

Etiopatogeneza stečenog holesteatoma srednjeg uha je još kontroverzna. Većina studija je usmjerenja na istraživanje razvojnih, epidemioloških, hormonalnih i genetskih faktora, kao i terapije, koji bi mogli doprinijeti boljem sagledavanju i razumijevanju njegove patogeneze [48]. Jatrogene ili nejatrogene traume membrane timpani poput perforacije, retrakcije, transpozicije ili invaginacije, patološke promjene mukoznog sloja membrane timpani i kavuma timpani, infekcija uha i disfunkcija Eustahijeve tube čine najčešće etiopatogenetske faktore u nastanku stečenog holesteatoma srednjeg uha [29, 49, 50].

Glavni etiološki faktori u razvoju stečenog holesteatoma su [50, 51]:

- a) *Dugotrajna disfunkcija Eustahijeve tube*, što dovodi do snižavanja pritiska u srednjem uhu, slabe pneumatisacije srednjeg uha i/ili mastoidnog nastavka i formiranja retrakcionih džepova i invaginacija (*atelektaza i adhezivni hronični otitis*),

b) *Inflamatorna stanja*, poput hroničnog sekretornog otitisa, koja rezultiraju nastankom negativnog pritiska u srednjem uhu i formiranjem retrakcionih džepova i invaginacija.

*Primarni stečeni holesteatom* nastaje na bazi duboke retrakcije membrane timpani u kojoj se akumulira keratinski epitel, najčešće u području *pars flaccida* [8, 41, 52]. *Sekundarni stečeni holesteatom* nastaje kao posljedica migracije epitela u srednje uho kroz perforaciju membrane timpani, uzrokovanoj traumom, jatrogeno tokom otohirurške intervencije ili hroničnom iritacijom kod akutnih recidivirajućih i hroničnih upalnih procesa srednjeg uha [8, 53]. Četiri teorije objašnjavaju nastanak sekundarnog tipa stečenog holesteatoma:

a) *Teorija invaginacije ili teorija retrakcionog džepa*:

Zasnovana je na prepostavci da su prekursori holesteatoma retrakcioni džepovi u području *pars flaccida* membrane timpani, koji su uzrokovani negativnim pritiskom u srednjem uhu. Naknadna akumulacija deskvamiranog epitela u retrakcionom džepu dovodi do stvaranja holesteatoma [34, 54].

b) *Teorija epitelne invazije ili migracije (imigraciona teorija)*:

Prema ovoj teoriji skvamozni epitel s ivica traumatski ili jatrogeno uzrokovane perforacije membrane timpani migrira u srednje uho. Skvamozni epitel, koji je rezistentniji na hroničnu infekciju, urasta u mukozni sloj srednjeg uha i nastavlja nekontrolisani rast, čime se formira matriks i vrećasta struktura perimatriksa od vezivnog tkiva mukoznog sloja srednjeg uha [55].

c) *Teorija hiperplazije bazalnih ćelija (teorija papilarnog urastanja)*:

Prema teoriji hiperplazije bazalnih ćelija mikrociste, ispunjene keratinom, ili pseudopodi, formirani u bazalnom sloju epitela *pars flaccida* membrane timpani, migriraju u subepitelno tkivo Prussak-ovog prostora, što rezultira stvaranjem holesteatoma [54, 56, 57].

d) *Teorija skvamozne metaplazije*:

Hronična upala dovodi do metaplazije cilindričnog epitela mukoznog sloja srednjeg uha u pločasto slojeviti epitel, koji potom može proizvoditi keratin, odnosno matriks holesteatoma. Uvećani holesteatom tada može dovesti do dezintegracije i perforacije membrane timpani, što rezultira stanjem tipičnim za stečeni kolesteatom [54, 58].

### **1.7.1. Patogeneza atik holesteatoma**

Utvrđeno je nekoliko teorija o patogenezi atik holesteatoma: *teorija retrakcije, teorija papilarne proliferacije, teorija imigracije i teorija metaplasije.* Sudhoff i Tos ističu prednost kombinacije teorije retrakcije i proliferacije u razjašnjenju patogeneze ovog tipa holesteatoma. Usljed učestalih inflamatornih procesa, udubljenja na timpaničkoj dijafragmi ostaju blokirana otečenom sluznicom i gustim mukoidnim eksudatom tako da se razvija negativan pritisak u atiku tokom dužeg perioda. *Pars flaccida* se uvlači u *Prussakov* prostor i dalje u atik, formirajući duboki retrakcioni džep [34].

Nakon početne faze formiranja retrakcionog džepa, u određenim slučajevima zbog proliferacije keratinocita i narušavanja mehnizma samočišćenja, nastaje akumulacija debrisa u džepu, stvaranja kruste i okolne inflamacije što se može smatrati preholesteatomskim stanjem. Prošireni retrakcioni džep poprima oblik konusa u čijem centru se nakupljaju keratinociti pod čijim pritiskom dolazi do stvaranja i ekspanzije mikroholesteatoma. Sjedinjavanjem mikroholesteatoma nastaje holesteatom, koji dezintegriše dno džepa i širi se u atik, započinje osteolizu okolnih osikula i skutuma. Prošireni holesteatom djeluje kao opstruktor ventilacionih puteva u timpaničkoj dijafragmi, izazivajući dugotrajan, snažan negativan pritisak u šupljini atika i mastoida. U ovom stanju holesteatom brzo raste u čitav atikomastoidni prostor [33, 34, 44].

### **1.7.2. Patogeneza sinus holesteatoma**

Zasnovano na kliničkim i imunohistohemijskim istraživanjima, patogeneza sinus holesteatoma je podijeljena u nekoliko faza, kombinujući teoriju retrakcije i proliferacije: *stadijum sinus retrakcionog džepa, stadijum proliferacije (podijeljen na podstadijum formiranja i fuzije konusa), stadijum ekspanzije sinus holesteatoma i resorpcije kosti.* Aktivan rast i koštana resorpcija vrlo brzo dovode do značajne ekspanzije holesteatoma, koji može u potpunosti da zauzme kompletan kavum timpani i mastoidni kavitet, destruiše dugi nastavak inkusa u zoni lenticularnog nastavka i gornji zid spoljašnjeg slušnog kanala, odnosno prednjeg zida mastoida. Jednom uspostavljen stadijum ekspanzije sinus holesteatoma se karakteriše nastankom niza komplikacija poput paralize facijalnog nerva, fistule semicirukularnih kanala ili difuznog labirintitisa [33, 34, 44].

### **1.7.3. Patogeneza tensa retrakcionog holesteatoma**

Patofiziološke osnove nastanka tensa retrakcionog holesteatoma se zasnivaju na direktnoj korelaciji između stepena atelektaze i zapremine srednjeg uha. Retrakcija *pars tensa*

smanjuje zapreminu srednjeg uha i tako prema Boyle-ovom zakonu (zapremina x pritisak = konstanta) djeluje kao amortizer pritiska. Efekat suzbijanja negativnog pritiska srednjeg uha zavisi od stepena retrakcije i opsega mastoidne pneumatisacije. Negativni pritisak srednjeg uha može nastati zbog selektivne disventilacije epitimpanona, koja je obično manja kod pacijenata s retrakcijom membrane timpani [59, 60]. *Marchioni* i saradnici hipotetišu postojanje *sindroma selektivne epitimpaničke disventilacije*, koji uključuje prisustvo atik retrakcionog džepa ili holesteatoma s normalnom tubarnom funkcijom, kompletном epitimpaničkom dijafragmom i blokадom istmusa [61].

Egzacerbacijom inflamatornih procesa otečena sluznica i gusti mukoidni eksudat blokiraju prednje timpaničko suženje, kao jedini put ventilacije između Eustahijeve tube i atikomastoidne šupljine, što uzrokuje nastanak negativnog pritiska u atiku i mastoidu. Kao posljedica nastaje duboki atrofični retrakcionalni džep od adheriranog zadnjeg gornjeg kvadranta membrane timpani s holesteatomom, koji raste i razara inkudostapedijalni zglob i širi se u atikomastoidnu šupljinu kroz zadnje timpanalno suženje ispod osikula. Ako je timpanička dijafragma membranozna, a zadnje timpaničko suženje zatvoreno, holesteatom dugo ostaje samo u niši ovalnog prozora ili sinusu timpani, jer se u atikomastoidnoj šupljini ne razvija negativni pritisak, čije odsustvo ne znači da ne postoji pokretačka sila za širenje bolesti u atikomastoidnu šupljinu [33, 34, 44].

#### 1.7.4. Osteodestruktivne karakteristike holesteatoma

Destruktivno dejstvo holesteatoma na kost objašnjavaju tri teorije:

- a) *Mehanička teorija* objašnjava da osteoklastična resorpacija kosti može nastati na mjestima gdje je direktno indukovana adekvatnim pritiskom ili prenesena u kavum timpani sa ili bez prisustva holesteatoma [62-64].
- b) *Hemiska teorija* o osteodestruktivnoj aktivnosti holesteatoma datira još od 1950. godine. Područja koštane destrukcije se najčešće mogu uočiti na mjestima rupture cistične vreće holesteatoma, zahvaljujući pojedinim supstancama poput hidroksiapatita, anorganske koštane komponente koja pokazuje visok stepen solubilnosti u uslovima niskih pH vrijednosti, što pogoduje destruktivnim aktivnostima holesteatoma u resorpciji kostiju. Takođe su pronađene značajno niže pH vrijednosti keratina holesteatoma u odnosu na sluznicu antruma, koje značajno doprinose procesu dekalcifikacije susjednih koštanih struktura [65-67].
- c) *Mehaničko-hemiska teorija* pridaje veći značaj aktivnosti epidermisa holesteatoma, koji potpomaže aktivnost subepiteljnog granulacionog tkiva

interakcijom brojnih faktora: enzimatskim djelovanjem kolagenaza, plazminogena, N-acetil- $\beta$ -heksozaminodaze (*HEX*), aktivacijom osteoklasta i stvaranjem pritiska, aktivnostima izoformi azot-monoksida (eng. *NO - nitric oxid*), bakterija, bakterijskih biofilmova i lipopolisaharida, ulogom medijatora inflamacije u stimulaciji hroničnog upalnog procesa srednjeg uha, aktivacijom monocita i makrofaga [68, 69].

#### **1.7.5. Mikromorfološki i imunološki aspekti**

Nakupljanje ćelija deskvamiranog epitela i keratinocita u tkivu holesteatoma je praćeno invazijom ćelija imunog sistema, uključujući *Langerhans*-ove ćelije, T-ćelije i makrofage. Proces je stimulisan neravnotežom epitelne proliferacije, diferencijacije keratinocita i maturacije, kao i prolongiranim apoptozom [70]. Migraciju ćelija zamjenjuje hiperplazija inflamatornih ćelija, dok su markeri hiperproliferacije citokeratin 16 (eng. *CK16 - Cytokeratin 16*), antigen Ki-67 (eng. *Antigen KI-67*), proliferirajući ćelijski nuklearni antigen (eng. *PCNA - Proliferating cell nuclear antigen*), trombomodulin, argirofilna regija nuklearnih organizatora (eng. *AgNORs; Argyrophilic nucleolar organizer regions*) i timidin, čija je ekspresija naročito izražena u području *anulus timpanicus*-a, okolnog meatusa i timpaničke regije [48, 50, 71-74].

Profil ekspresije holesteatoma je sličan metastatskom tumoru i hronično inflamiranom tkivu. Tkivo holesteatoma ispoljava mnoge relevantne tumorske gene, koji bi mogli imati značajnu ulogu u patogenezi ovog oboljenja [75]. Jin i saradnici su dokazali prekomjernu ekspresiju receptora epidermalnog faktora rasta (eng. *EGFR - Epidermal growth factor receptor*) u tkivu holesteatoma, ističući da bi varijacije u regulaciji gena za EGFR mogle biti povezane s proliferativnim aktivnostima ovog oboljenja [76]. Ergun i saradnici kao dokaz poremećaja regulacije gena u tkivu holesteatoma navode prekomjernu ekspresiju transformišućeg faktora rasta (eng. *TGF - Transforming growth factor*), kao potentnog stimulatora ćelijskog rasta i specifičnog liganda, uključenog u aktivaciju EGFR [77].

Koneksini ili proteini intercelularne komunikacije pukotinastim vezama (eng. *GJIC - Gap junction intercellular communication*) su porodica strukturalno povezanih transmembranskih proteina koji se okupljaju da formiraju intercelularne kanale koji omogućavaju brži transport odabranih jona i malih molekula, čiji poremećaj može biti povezan s patogenezom stečenog holesteatoma. Istraživanja su dokazala poremećaj regulacije ekspresije i promjenu lokacije *koneksina 26 i 43* u tkivu holesteatoma srednjeg

uga u odnosu na zdravu kožu spoljašnjeg slušnog kanala i retroaurikularne regije [78]. Klenke i saradnici su otkrili značajno veću ekspresiju gena GJB2 (eng. *GJB2 - Gap junction beta-2 protein*), poznatijeg kao *koneksin 26*, u holesteatomskom tkivu u odnosu na kožu spoljašnjeg slušnog kanala [75]. Mutacije u *koneksin 26* genu imaju potencijal da promijene razvoj holesteatoma i/ili utiču na agresivnost lezije. Takođe se smatraju uzrokom urođenog nesindromskog senzorineuralnog oštećenja sluha i hiperkeratotičnih oboljenja kože [79].

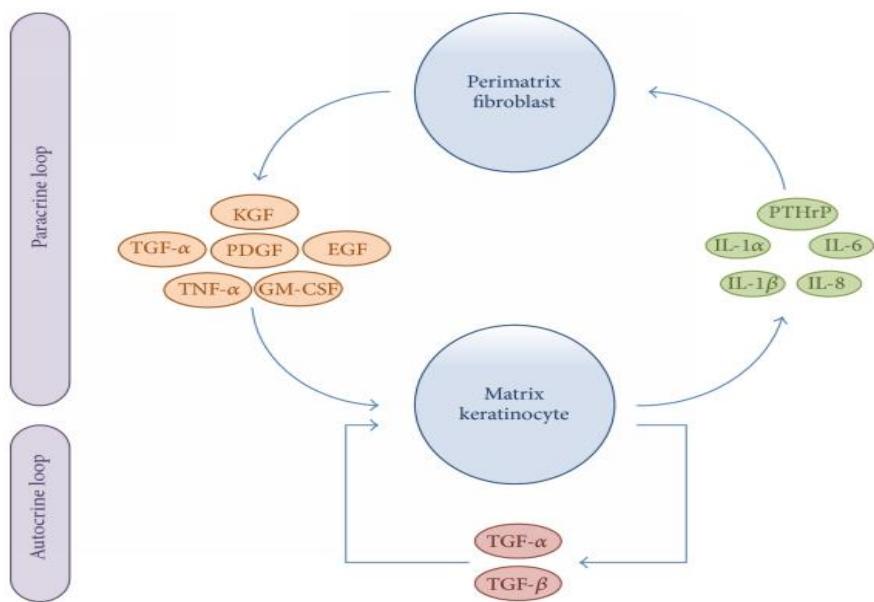
Inflamatorno uzrokovana epitelna proliferacija je povezana s povećanom ekspresijom litičkih enzima i citokina, uključujući arahidonsku kiselinu, intercelularni adhezivni molekul (eng. *ICAM - intercellular adhesion molecules*), receptorski aktivator za nuklearni faktor kB ligand (eng. *RANKL - Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*), interleukin-1, -2 i -6 (eng. *IL -Interleukin*), matriks metaloproteinaze -2 i -9 (eng. *MMP - Matrix metalloproteinase*), kao i faktor nekroze tumora-alfa (eng. *TNF- $\alpha$  - Tumor necrosis factor alpha*), koji su djelimično indukovani bakterijskim antigenima, uključujući endotoksine kao što su lipopolisaharidi [1, 80, 81]. Povećana proliferativna aktivnost epitelnih ćelija je povezana s povećanim jedarnim sadržajem u bazalnim ćelijama holesteatoma što morfološki korelira s bazalnom hiperplazijom, naročito u područjima inflamatorne infiltracije [82, 83].

Mast-ćelije su prisutne u velikom broju u tkivu holesteatoma i mogu doprinijeti hroničnoj upali. Histamin i aktivirajući faktor trombocita (eng. *PAF - Platelet-activating factor*) dovode do poremećaja funkcije Eustahijeve tube, što rezultira poremećajem mukociliarnog klirensa. Ovaj proces se pogoršava s IL-1, PAF i TNF- $\alpha$  indukovanim hipersekrecijom mukusa u srednjem uhu, što dovodi do povećanja viskoznosti sekreta [1, 5, 84]. Efektorne ćelije, uključujući osteoklaste, oslobađaju citokine koji dovode do propadanja ekstracelularnog matriksa kosti i hiperproliferacije, što rezultira makroskopski vidljivom erozijom kosti [1, 5, 8, 84, 85].

Ostali faktori od značaja za eroziju kosti uključuju kolagenaze, osteoklaste, osteoblaste, azot- monoksid, bakterije, uključujući i bakterijske biofilmove, kao i rupturu retrakcionog džepa. Veliki broj monocita i makrofaga se akumuliraju u kontakt-zoni između holesteatoma i kosti, ali samo multijedarni osteoblasti ostaju povezani s nestajanjem površine kosti [52, 86].

Interakcije između keratinocita matriksa i fibroblasta perimatriksa imaju značajnu ulogu u procesu homeostaze tkiva unutar holesteatoma. Diferencijacija, proliferacija i migracija keratinocita matriksa zahtijeva i parakrinu i autokrinu signalizaciju. Keratinociti oslobađaju proinflamatorne citokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i peptid sličan paratiroidnom hormonu (eng. *PTHRP - Parathyroid hormone-related peptide*), što indukuje fibroblaste da

luče nekoliko citokina, kao što su faktor rasta keratinocita (eng. *KGF - Keratinocytes growth factor*), faktor koji stimuliše koloniju granulocita i makrofaga (eng. *GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), EGF, TNF- $\alpha$ , faktor rasta koji potiče iz trombocita (eng. *PDGF - Platelet-derived growth factor*) i TGF- $\alpha$ . Citokini produkovani iz fibroblasta zauzvrat indukuju diferencijaciju, proliferaciju i migraciju keratinocita matriksa. Osim toga, TGF- $\alpha$  i TGF- $\beta$ , preregulisani autokrinim mehanizmom, regulišu proliferaciju i diferencijaciju keratinocita (Slika 8) [54, 87].



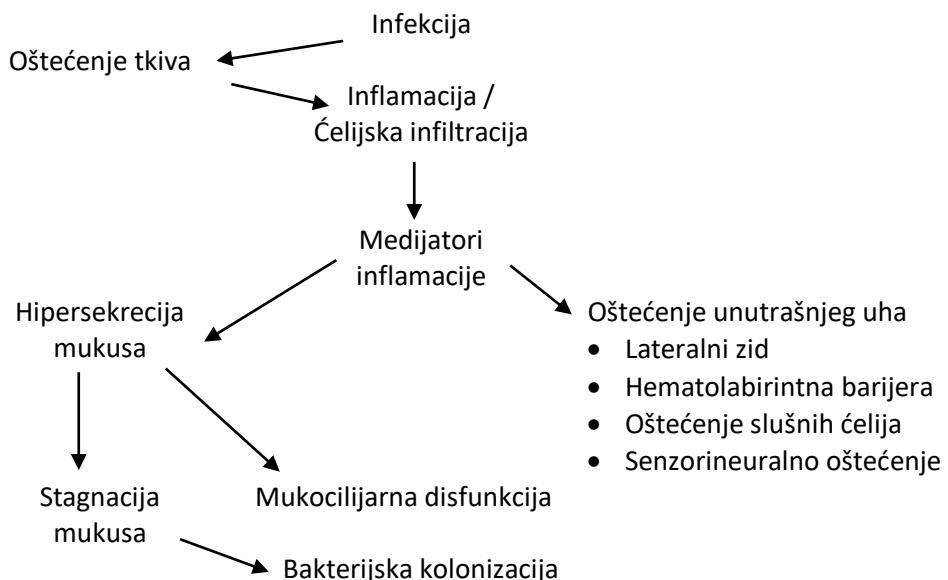
*Slika 8. Šematski prikaz parakrinih i autokrinih interakcija između keratinocita matriksa i fibroblasta perimatriksa [54].*

#### 1.7.6. Medijatori inflamacije i holesteatom srednjeg uha

Nastanak holesteatoma karakteriše kaskada reakcija na molekularnom nivou, koje uključuju indukciju matriks metaloproteinaze, oslobađanje radikala kiseonika i ostalih medijatora inflamacije, što dovodi do destruktivnog dejstva holesteatoma, zasnovanog na proteolitičkoj aktivnosti, koštanoj resorpciji i retrutovanju inflamatornih ćelija [88]. Postoje mnogobrojni celularni i biohemijski procesi, koji nastaju kao posljedica oštećenja tkiva, a koji imaju značajnu ulogu za dalji ishod upalnog procesa. Centralno mjesto u upalnom procesu zauzimaju medijatori inflamacije, koji uključuju proteine, peptide, glikoproteine, citokine, metabolite arahidonske kiseline (*prostaglandini, leukotrieni*), azot-monoksid i slobodne radikale kiseonika. Ova jedinjenja proizvode epitelne i endotelne ćelije, kao i infiltrirajuće inflamatorne ćelije. Upalni medijatori su "mač sa dvije oštice" s obzirom na to da, pored

potencijala da se izbore protiv infekcije, mogu i da oštete domaćina. Upalni proces srednjeg uha karakteriše upalna reakcija na akutne ili perzistentne stimuluse koje odlikuje akumulacija celularnih i hemijskih medijatora u prostoru srednjeg uha [5].

Medijatori inflamacije imaju vodeću ulogu u patogenezi upalnog procesa srednjeg uha i holesteatoma s aspekta pokretanja i održavanja upalnog odgovora na infekciju i leziju. Mogu da budu jedan od razloga što se kod nekih pacijenata dešava progresija iz akutne u hroničnu fazu inflamatornog procesa srednjeg uha, kao i nastanka holesteatoma. Na Slici 9 su šematski prikazani patološki efekti medijatora inflamacije kod upalnog procesa srednjeg uha. Moguće je da neki upalni medijatori, kao što su histamin i faktor aktivacije trombocita, dovode do disfunkcije Eustahijeve tube što uzrokuje smanjenje mukociliarnog klirensa. Histamin takođe uzrokuje vazodilataciju, povećavajući vaskularnu permeabilnost i edem sluznice srednjeg uha [89-91].



*Slika 9. Šematski prikaz patoloških efekata medijatora inflamacije kod upalnog procesa srednjeg uha [5].*

Faktor aktivacije trombocita je membranski fosfolipidni metabolit koji se oslobađa kroz proces stimulisane preregulacije [92]. Njegove aktivnosti uključuju stimulaciju oslobađanja i metabolizma arahidonske kiseline, uključujući povećanje vaskularne permeabilnosti i aktivacije neutrofila, monocita i makrofaga [93, 94]. Kao posljedica dolazi do zadržavanja bakterijskih produkata, poput lipopolisaharida na ćelijskim zidovima i bakterijskih antigena u šupljinama srednjeg uha, što uzrokuje hroničnu upalnu reakciju sa stalnim oslobađanjem citokina i metabolita arahidonske kiseline, konsekventnim prolongiranjem upale i lediranjem ćelija domaćina [5].

Drugi mogući mehanizam se odvija putem medijatora inflamacije, kao što su TNF- $\alpha$ , IL-1 i PAF, koji indukuju sekreciju mukusa iz epitela srednjeg uha. To može da izazove: povećanu viskoznost sekreta, smanjivanje mukocilijskog klirensa i zadržavanje bakterijskih toksina, koji uzrokuju hronični upalni proces i oslobođanje upalnih medijatora. U većini slučajeva, u indukciji formiranja holesteatoma, učestvuju poremećaji unutrašnje molekularne regulacije zajedno sa spoljašnjim stimulusima u formi proinflamatornih citokina, faktora rasta i/ili bakterijskih toksina. Patogenetski razlog nekontrolisane proliferacije u tkivu holesteatoma ni do danas u potpunosti nije razjašnjen. Citokini koji se oslobođaju tokom upalnog procesa u perimatriksu holesteatoma mogli bi biti odgovorni za destrukciju kosti [5, 70].

Mehanizmi nastanka oštećenja sluha, uključujući senzorneuralno, kao sekvele hronične upale srednjeg uha, još su predmet naučnih studija. U eksperimentalnom animalnom modelu, aplikacija citokina i lipopolisaharida (LPS), kao bakterijskog toksina, kroz membranu okruglog prozora izaziva senzorneuralno oštećenje sluha što je identifikovano putem auditivnih evociranih potencijala moždanog stabla [5]. LPS kao produkti bakteriolize mogu direktno oštetiti spoljašnje i unutrašnje slušne ćelije, kao i membranu tektoriјu [95]. Dokazano je da LPS indukuju prekomjernu produkciju citokina u kohlei i oštećuju reaktivne slobodne radikale, što povećava permeabilnost hemato-labirintne barijere [5, 96]. LPS takođe uzrokuje ekspresiju sintaze azot-monoksida u različitim kohlearnim ćelijama, uključujući unutrašnje, spoljašnje, stubičaste i ivične, kao i njihovim nervnim vlaknima [97].

LPS mogu uzrokovati smanjenje kohlearnog protoka krvi, što se manifestuje poremećajem mikrovaskularizacije. Transdukcija zvuka je metabolički zahtjevna, a normalna funkcija mikrovaskulacije na lateralnom zidu kohlee je presudna u regulaciji transporta jona i održavanju ravnoteže tečnosti [98-101]. Poremećaj krvne barijere u području *stria vascularis* uzrokuje deficit hranjivih supstanci i kiseonika u tkivu i akumulaciju toksičnih metabolita [97]. Istanjanje krvnih derivata preko lateralnog zida kohlee, uslijed povećane permeabilnosti, uzrokuje poremećaj jonske hemostaze u endolimfi, koja se odlikuje inhibicijom recikliranja K-jona, a kao posljedica nastaje senzorneuralno oštećenje sluha [5].

#### **1.7.6.1. Faktor nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ )**

Faktor nekroze tumora-alfa ( $TNF-\alpha$ ) se ističe kao jedan od glavnih medijatora inflamacije, koji zajedno sa aktivatorom receptora nuklearnog kappa-B liganda (*RANKL*) i IL-1 i IL-6

učestvuje u procesu destrukcije i pregradnje kosti [85, 102]. Dva TNF- $\alpha$  specifična receptora, nazvana TNF receptor 1 (*TNF-R1*) i TNF receptor 2 (*TNF-R2*) imaju slične aktivnosti. Oni su uključeni u upalni proces povezan s erozijom kosti, a mogu izazvati i apoptozu (*programirana smrt ćelija*), koja je posebno povezana s *TNF-R2*. Dokazana je korelacija stepena ekspresije (broja receptora) TNF- $\alpha$  u tkivu stečenog holesteatoma srednjeg uha sa stepenom inflamacije. Međutim, precizni mehanizmi u procesu njihovog djelovanja još su predmet naučnih istraživanja [103].

*TNF- $\alpha$* , koji je identifikovan u holesteatomu, promoviše resorpciju kosti različitog stepena. Njegov direktni uticaj se ogleda u diferencijaciji i maturaciji osteoklasta, a indirektno i na koštani matriks [104]. *TNF- $\alpha$*  nije jedini faktor uključen u resorpciju kosti, gdje on djeluje u saradnji s IL-1 i RANKL. Navedene supstance mogu zajedno regrutovati, diferencirati i aktivirati osteoklaste. Lokalni nivo *TNF- $\alpha$*  je u direktnoj povezanosti sa stepenom destrukcije kosti kod stečenog holesteatoma srednjeg uha [105]. *TNF- $\alpha$*  produkuju aktivirani makrofagi, limfociti ili monociti, a glavni podsticaj za njegovu proizvodnju su lipopolisaharidi, koji čine sastavni dio membrana gram-negativnih bakterija [103, 106]. Nakon proizvodnje i oslobađanja, *TNF- $\alpha$*  se veže za specifične receptore *TNF-R1* i *TNF-R2*, produkujući biološke efekte. TNF receptori, a posebno *TNF-R2*, mogu pokrenuti apoptozu. Glavni fiziološki učinak *TNF- $\alpha$*  je promovisanje imunološkog i upalnog odgovora regrutovanih neutrofila i monocita na mjestu infekcije s njihovom popratnom aktivacijom iz čega proizlaze njegovi brojni efekti u organizmu. Oslobođen u nižim koncentracijama, djeluje na endotelne ćelije uzrokujući vazodilataciju i podstičući te ćelije da luče hemokine [107].

*Yong-Soo* i saradnici su istražujući značaj *TNF- $\alpha$*  kod hroničnog sekretornog otitisa na animalnom modelu - štakoru, indukovanim s endotoksinom *Pseudomonas aeuroginosa*, dokazali mogućnost inhibicije upalnog procesa primjenom *TNF- $\alpha$*  antagonista (sa *TNF-R1*), što može imati visok značaj kod liječenja sekretornog otitisa, prevencije komplikacija i holesteatoma [108].

*Yetiser* i saradnici su pronašli značajno više nivo *TNF- $\alpha$*  i IL-1 kod 20 pacijenata s hroničnom upalom srednjeg uha i holesteatomom u odnosu na 16 pacijenata bez prisustva holesteatoma i zaključili da je destrukcija kosti posredovana ovim citokinima [109]. *TNF- $\alpha$* , TGF-beta 1 i 2 i IL-1 i IL-6, su imunolokalizovani u epitelnom i subepitelnom sloju holesteatoma humanog porijekla, s većim intenzitetom bojenja u poređenju s neinflamiranim kožom spoljašnjeg slušnog kanala. Povišen nivo navedenih medijatora

inflamacije u epitelnom sloju i stromi holesteatoma značajno korelira sa stepenom erozije slušnih koščica i okolne kosti, kao i sa prisustvom granulacionog tkiva [110].

Hipotetički TNF- $\alpha$  djeluje direktno uzrokujući eroziju kosti, a indirektno stimulacijom oslobađanja lizozomalnih enzima. Istraživanja su dokazala značajno povećan nivo TNF- $\alpha$  i lizozomalnih enzima u epitelu i subepitelnom tkivu holesteatoma u komparaciji sa zdravom kožom. Nivoi ovih indeksa odražavaju kliničku ozbiljnost bolesti, što se odražava njihovim značajnim porastom u slučajevima erozije dvije ili tri slušne koščice, duralne ploče, koštanog kanala sinusa, facijalnog nerva i proširenih holesteatoma [111]. I dalje se sprovode istraživanja o potencijalnoj terapijskoj upotrebi TNF- $\alpha$  antitijela i sistemskih inhibitora TNF- $\alpha$  u suzbijanju upalnog procesa, a samim tim i inhibicije procesa destrukcije kosti [112].

#### **1.7.6.2. Interleukini**

Interleukini (IL) imaju značajnu ulogu u aktivaciji i diferencijaciji imunoloških ćelija, kao i u njihovoj proliferaciji, sazrijevanju, migraciji i adheziji. Takođe, imaju proupatna i protivupalna svojstva. Primarna funkcija interleukina je, dakle, modulacija rasta, diferencijacija i aktivacija tokom upalnih i imunoloških odgovora. Interleukini se sastoje od velike grupe citokina (izlučenih proteina /signalnih molekula), koji mogu izazvati brojne reakcije u ćelijama i tkivima, vezujući se za receptore visokog afiniteta na površini ćelija. Imaju i parakrinu i autokrinu funkciju [113]. Interleukin -1 citokini (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-1Ra) imaju značajnu ulogu u imunološkoj regulaciji i upalnim procesima indukujući ekspresiju mnogih efektornih proteina, kao što su citokini/hemokini, sintetaze azot-monoksida i matriks metaloproteinaze [114].

*Barsky* i saradnici ističu značaj porodice IL-1, uključujući IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i antagonist receptora IL-1, kao važne komponente urođenog imunološkog sistema. IL-1 $\beta$  nije samo važan genetski faktor domaćina, već je i ključni proinflamatorni citokin, koji može regulisati ekspresiju nekoliko molekula uključenih u proces inflamacije [115].

IL-1 se prvenstveno sintetizuje aktivacijom makrofaga. Za stimulaciju produkcije IL-1 odgovorni su LPS i leukotrieni [116-118]. TNF takođe stimuliše sintezu IL-1 [119]. Faktor aktivacije trombocita može povećati produkciju IL-1 oslobađanjem metabolita leukotriena [120]. Brojne različite ćelije, zadužene za regulaciju imunog odgovora, mogu da produkuju IL-1. Dokazano je takođe da IL-1 stimuliše sintezu TNF, IL-2, IL-6 i IL-8, pospješuje oslobađanje drugih citokina i stimuliše metabolizam arahidonske kiseline u putevima ciklooksigenaze i lipooksigenaze [121-126]. IL-1 indukuje proizvodnju IL-1 u

neutrofilima mehanizmom pozitivne povratne sprege, kao i molekule adhezije ćelija (ICAM -1, VCAM - 1) koje potom stimulišu migraciju leukocita [127-129].

IL-1 se sastoji od dva glavna 17kDa polipeptida, IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ . Pronađeni geni na hromozomu 2 kodiraju ove dvije molekularne vrste, koje imaju iste biološke aktivnosti i vezuju se za isti receptor na površinama ćelija [116, 130]. IL-1 $\beta$  uglavnom produkuju upalne ćelije kao što su makrofagi i monociti i oslobađaju ga u ekstracelularni prostor, dok je IL-1 $\alpha$  lokalizovan intracelularno ili na površini tih ćelija [131, 132].

Epitelne ćelije holesteatoma i upalne ćelije okolnog granulacionog tkiva mogu da produkuju IL-1. Nivoi IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  su značajno veći kod holesteatoma nego u normalnom pločastom epitelu. IL-1 je uključen u proces koštane resorpcije, a dokazano je i da stimuliše proliferaciju keratinocita [133, 134]. IL-1 je jedna od najaktivnijih supstanci koje izazivaju resorpciju kostiju aktivacijom osteoklasta [135]. Ovo uništavanje kosti posredovano IL-1 je jedna od kliničkih karakteristika koje signalizuju početak hronične upale srednjeg uha. Schilling i saradnici ukazuju da se IL-1 može oslobođiti dezintegracijom keratinocita i ćelija monocitno-makrofagne loze, stimulisati proliferaciju holesteatomskog epitela na autokrini način i doprinijeti intenzivnijoj razgradnji kosti u prisustvu holesteatoma [136].

Britze i saradnici, analizirajući 44 profila citokina u holesteatomu i okolnom tkivu, pronalaze visoke nivoje IL-8, IL-21 i niske IL-6 kod holesteatoma u poređenju s kožom spoljašnjeg slušnog kanala. Autori navode da IL-21 može imati važnu ulogu u funkciji epitela i patogenezi holesteatoma zbog sposobnosti da indukuje hiperplaziju [137]. Miyasato i saradnici, istražujući odnos upalnih mehanizama odgovornih za apsorpciju kosti i proliferaciju epithelialnih ćelija holesteatoma, pronalaze značajnu inhibiciju ekspresije RANKL i Ki-67, odgovornih za produkciju IL-6 i IL-8 nakon tretmana s Dexametason-om. Autori ukazuju na potrebu budućih istraživanja o antiinflamatornoj ulozi kortikosteroida kod holesteatoma srednjeg uha [138].

#### 1.7.6.3. Matriks metaloproteinaze

Matriks metaloproteinaze (MMP) pripadaju porodici cink-metaloenzima koji se luče kao latentni proenzimi i aktiviraju tokom precesa proteolitičke razgradnje [139]. MMP su visoko homologne, multidomenske, metaloproteinaze vezane za cink ( $Zn^{2+}$ ) koji razgrađuju različite proteinske komponente ekstracelularnog matriksa [140]. MMP su podijeljene na osnovu specifičnosti njihovih aktivnosti i strukturalnih karakteristika na kolagenaze, želatinaze, stromelizine, matrilizine, membranski tip (MT-MMP) i ostale MMP. Različite klase MMP imaju specifične strukturalne karakteristike, koje ih razlikuju od prototipske MMP strukture.

Tipična MMP se sastoji od *propeptida*, *katalitičkog metaloproteinaza domena*, *vezivnog peptida* i *hemopeksin domena* [141-143].

MMP-2 i MMP-9 pripadaju porodici želatinaza i sintetišu se u keratinocitima, monocitima, alveolarnim makrofagima, polimorfonuklearnim neutrofilnim granulocitima i ćelijama brojnih malignih tumora. MMP-2 i MMP-9 su odgovorne za razgradnju *želatina*, *laminina* i *nidogena*, a dokazano je da MMP-1 može razgraditi i nativni *kolagen tipa I* i pokrenuti proteolitičku aktivnost MMP-9 i MMP-13. Istraživanja su dokazala da MMP-9 vrši razgradnju *kolagena tipa IV* [144, 145].

MMP promovišu ćelijsku proliferaciju, migraciju i diferencijaciju i mogu imati ulogu u ćelijskoj apoptozi, angiogenezi, reparaciji tkiva i imunom odgovoru. Takođe, mogu uticati na bioaktivne molekule na ćelijskoj površini i modelirati različite ćelijske i signalne puteve. Promjene u ekspresiji i aktivnosti MMP događaju se u normalnim biološkim procesima, poput graviditeta i zarastanja rana, ali su, takođe, uočene i kod kardiovaskularnih oboljenja kao što su ateroskleroza, aneurizma i venski varikoziteti, osteomuskularnih poremećaja poput osteoartritisa i resorpcije kostiju te kod različitih vrsta karcinoma. MMP su takođe uključene u progresiju i invaziju tumora [140].

MMP-9 se produkuje u različitim ćelijama, uključujući ćelije epitela, fibroblaste, keratinocite, osteoblaste, ćelije dendrita, makrofage, granulocite i T-ćelije [146]. MMP-9 ima ključnu ulogu u migraciji inflamatornih ćelija i destruktivnom ponašanju holesteatoma iako nivo MMP-9 u serumu ne mora direktno da odražava opseg lokalne tkivne inflamacije [147]. Uloge u upalnim procesima s remodeliranjem kosti, poput periodontitisa, pripisuju se MMP-9 (92 kDa želatinaza) i MMP-2 (72 kDa želatinaza), koje degradiraju bazalnu membranu kolagena tipa IV [140].

Imunohistohemijski je utvrđena ograničena ekspresija MMP-9 i MMP-2 u epitelnim ćelijama bazalnih i suprabazalnih slojeva holesteatoma, značajnije MMP-9, u odnosu na tkivo spoljašnjeg slušnog kanala [148]. Preregulacija MMP-9 nije direktno indukovana glavnom debris komponentom bakterijskog endotoksina, keratinom ili holesterolom, već raznim citokinima koji su prisutni u debrisu i granulacionom tkivu. Mogući model preregulacije MMP-9 u epitelnim ćelijama holesteatoma, uključenim u imunološki odgovor na bakterijske produkte, zasnovan je na stimulaciji makrofaga u degradaciji tkiva i poizvodnji citokina. Ovi citokini mogu stimulisati epitelne ćelije da proizvode citokine i proteaze [149].

Naim i saradnici ističu da se MMP-2 i MMP-9 ponašaju kao destruktivni sistem u ekstracelularnom matriksu holesteatoma, promovišući prekompoziciju okolnih tkiva. Autori

su dokazali značajno veću ekspresiju MMP-2 i MMP-9 kod holesteatoma u odnosu na bazalne i suprabazalne slojeve zdrave kože spoljašnjeg slušnog hodnika [150]. *Erbek* i saradnici ističu da prekomjerna ekspresija dezintegrina i proteina, iz porodice MMP-10, -12 i -17 u holesteatomu, može imati veliki značaj u budućim izučavanjima patogeneze i modaliteta liječenja holesteatoma. Ovi proteini posjeduju adheziju molekula, utiču na proteolitičko oslobođanje molekula s površine ćelije i imaju važnu ulogu u oslobođanju medijatora poput faktora rasta, hormona i hemokina [151].

*Welkoborsky* tvrdi da bakterije unutar retrakcionog džepa proizvode antigene koji aktiviraju različite citokine i litičke enzime (*ICAM*, *RANKL*, *IL-1*, *IL-2*, *IL-6*, *MMP-2* i *MMP-9*), uzrokujući degradaciju ekstracelularnog koštanog matriksa i eroziju kosti [70]. *Rezende* i saradnici su dokazali ekspresiju gena za MMP i njihove specifične inhibitore (eng. *TIMP - tissue inhibitor of metalloproteinases*) putem RNA testova u tkivu holesteatoma i njihovu povezanost s težinom bolesti [152].

#### **1.7.7. Vaskularni aspekti**

Hiperproliferativni epiteln rast holesteatoma podržavaju brojni krvni sudovi, nastali kao posljedica povećane vaskularizacije. Stromu holesteatoma karakteriše mnoštvo krvnih sudova s intaktnom bazalnom membranom, posebno u područjima s obilnom infiltracijom makrofaga. Perivaskularnu ćelijsku infiltraciju obilježavaju angiogenetski faktori kao što su klaster diferencijacije 3 (eng. *CD3 - Cluster of differentiation 3*), KiM8, TGF-alfa, vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *VEGF - Vascular endothelial growth factor*) i humani histokompatibilni antigen (eng. *HLA-II - Human histocompatibility antigen*) kao markeri ćelijske aktivacije. Endotelne ćelije pokazuju intercelularne adhezijske molekule (*ICAM-1*, *ICAM-2*) i receptore vaskularnog endotelnog faktora rasta u povećanom boju [153].

#### **1.7.8. Mikrobiološki faktori**

Kao i u mnogim hroničnim infekcijama, holesteatom pokazuje povezanost s biofilmom bakterijske infekcije i/ili kolonizacije. *Pseudomonas aeruginosa* se smatra najrelevantnijim bakterijskim agensom u patogenezi holesteatoma, potom slijede *Staphylococcus aureus* i *Proteus mirabilis*. Biofilmovi dovode do oštećenja klirensa, jer su bakterije unutar biofilma dobro zaštićene od odbrambenih mehanizama domaćina, kao i sistemskih ili lokalnih antibiotika [5, 154]. Gram pozitivni anaerobni koki, *Bacteroides spp.* i *Fusobacterium spp.* su pronađeni u 50% analiziranih tkiva holesteatoma. Ekspresija beta-laktamaza kod

prethodno navedenih anaerobnih bakterija je česta i tu činjenicu treba uzeti u obzir kod antibiotske terapije ili perioperativne profilakse [155].

### **1.7.9. Medijatori inflamacije i sekundarni limfni organi**

*Kim* i saradnici pronalaze visok stepen ekspresije pojedinih medijatora upalnog odgovora (*TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$* ) kod ispitanika s opstruktivnom *sleep apnea*-om, čime se podržava hipoteza po kojoj povećani lokalni i sistemski upalni odgovor podstiču tonzilarnu proliferaciju, dok *Passali* i saradnici tvrde da visoke tkivne koncentracije pojedinih citokina (*TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6*) dugoročno slabe imunološku aktivnost i izazivaju patogene efekte [156, 157].

*Todorović* i saradnici, istražujući imunoregulatorne citokine kod hroničnog tonzilitisa, dokazuju da je produkcija Th1-citokina *TNF- $\alpha$*  i interferona gama (eng. *IFN- $\gamma$  - Interferon gamma*) kod rekurentnog tonzilitisa bila veća u komparaciji s tonzilarnom hipertrofijom. Autori su dokazali da je kod obje forme tonzilitisa produkcija Th1-citokina bila značajno veća u komparaciji s produkcijom Th2-citokina (*IL-6, IL-4*), što ukazuje na predominaciju celularnog u odnosu na humoralni tip imunog odgovora [158].

*Komorowska* i saradnici, proučavajući citokine, lokalno produkowane od strane limfocita, izolovanih iz hipertrofičnih nazofaringealnih i palatinalnih tonzila, dokazuju visoku koncentraciju *IL-2, IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$*  i *IFN- $\gamma$*  u kulturama palatinalnih, u odnosu na nazofaringealne ćelije. Autori ukazuju na predominaciju celularnog imunog odgovora (Th1) u tkivu palatinalnih tonzila [159].

## **1.8. Klinička slika i dijagnoza holesteatoma srednjeg uha**

### **1.8.1. Klinička slika holesteatoma srednjeg uha**

Evolucija nastanka i razvoja holesteatoma srednjeg uha često može da traje godinama bez naglašene kliničke manifestacije bolesti i bez prisustva agresivnih karakteristika, koje obično upućuju na potencijalni nastanak i razvoj otogenih komplikacija. Anamnestički podaci kod većine pacijenata ukazuju na sporadičnu, oskudnu i fetidnu sekreciju iz spoljašnjeg slušnog kanala, oslabljen sluh različitog stepena, šumove u uhu, ponekad bol u području uha i okolne regije, glavobolju, vrtoglavicu i nestabilnost pri hodu i stajanju. Gubitak slušne funkcije može biti evolutivno sporijeg, ali u nekim slučajevima i progresivnijeg toka. Inicijalno konduktivno oštećenje sluha, uslijed progresije bolesti i širenja patomorfoloških procesa s konduktivnog aparata srednjeg uha na kohleu, vremenom prelazi u mješovito, a potom u

ireverzibilno senzorineuralno oštećenje. Osteodestruktivne promjene na semicirkularnim kanalima, posebno horizontalnom, uzrok su nastanka vestibularne disfunkcije, koja se manifestuje vrtoglavicom i nestabilnošću pri hodu i stajanju [32, 54, 160, 161].

Prije antibiotske ere, holesteatomi su bili vrlo podložni sekundarnim bakterijskim infekcijama pa su u kliničkoj slici, osim specifičnih otoloških simptoma, vrlo često bili prisutni simptomi i znakovi infektivnog sindroma [162]. Posebna pažnja se mora posvetiti otoskopskom pregledu kod pedijatrijskih pacijenata, s obzirom na nespecifičnu anamnezu i atipičnu kliničku sliku, naročito u slučajevima jednostranih i suptilnijih formi holesteatoma [163]. Recidivirajuća ili permanentna sekrecija iz uha u vremenskom trajanju dužem od 14 dana, koja je na antibiotsku terapiju često rezistentna, kao i prisustvo progresivnog oštećenja sluha kod operativno tretiranog srednjeg uha, vrlo često ukazuju na prisustvo holesteatoma [164].

### **1.8.2. Dijagnoza holesteatoma srednjeg uha**

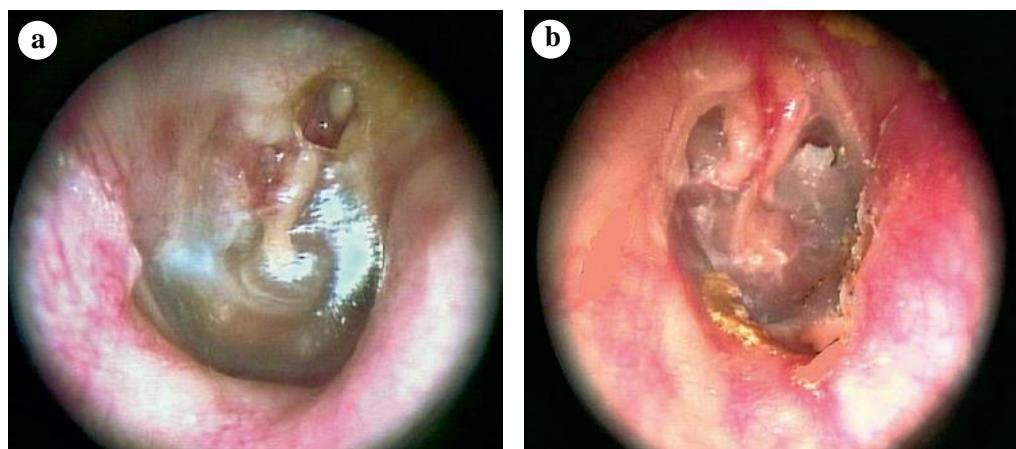
Dijagnoza holesteatoma srednjeg uha se postavlja na osnovu anamneze, kliničke slike, otoskopskog/otomikroskopskog/otoendoskopskog i ostalog otorinolaringološkog pregleda, kao i dodatnih mikrobioloških, radioloških i audioloških dijagnostičkih pretraga.

#### **1.8.2.1. Klinički otorinolaringološki pregled**

##### **1.8.2.1.1. Otoskopski pregled**

Otomikroskopskim i/ili otoendoskopskim pregledom se daje prednost u odnosu na klasični otoskopski jer omogućava optimalnu i najefektivniju vizuelizaciju anatomske strukture spoljašnjeg i srednjeg uha u dijagnostici holesteatoma, a posebno kod postoperativne evaluacije. Najčešće se uočava suva ili vlažna ivična perforacija membrane timpani, koja može obuhvatati različite segmente, zavisno od tipa hroničnog upalnog procesa srednjeg uha. U odnosu na podtip perforacije, najveću učestalost pokazuju atik, zadnja-gornja i perforacija koja zahvata sve segmente membrane timpani, označena kao subtotalni defekt. Tipičan otomikroskopski nalaz ukazuje na prisustvo matriksa holesteatoma, karakteristične sedefasto-bjeličaste boje, koji prominira kroz perforaciju membrane timpani, a u nekim slučajevima je vidljivo i prisustvo granulacija u kavumu timpani (Slika 10). Ukoliko granulacije epiteliziraju, nastaje polip koji često prominira kroz perforaciju iz kavuma timpani u spoljašnji slušni kanal, što može u značajnoj mjeri potencirati proces osteolize koštanih struktura. Uobičajen nalaz su i znakovi destrukcije zadnjeg-gornjeg koštanog zida spoljašnjeg slušnog kanala i lateralnog atika [32, 40, 165].

Otomikroskopski pregled dodatno omogućava mikroaspiraciju sekreta ili sadržaja iz spoljašnjeg slušnog kanala, srednjeg uha i postoperativnih trepanacionih kavita, uzimanje brisa sekreta za mikrobiološku analizu i biopsiju patološke promjene za patohistološku dijagnostiku. Prednost otoendoskopskog u odnosu na otomikroskopski pregled se ogleda u mogućnostima preciznijeg uvida i pristupa takozvanim slijepim lokacijama (eng. "Blind Spots"), gdje se često uočava prisustvo holesteatoma, kao što su atik, hipotimpanon, protimpanon, sinus timpani i facialni recesus [166].



**Slika 10.** Otoendoskopski prikaz: (a) holesteatom u prednjem atiku, koji inicijalno raste u pars flaccida i širi se prema glavi maleusa; (b) mezotimpanički holesteatom s inicijalnim rastom u zadnjoj polovini pars tensa, koji se širi medijalno duž stapesa i u sinus timpani [30].

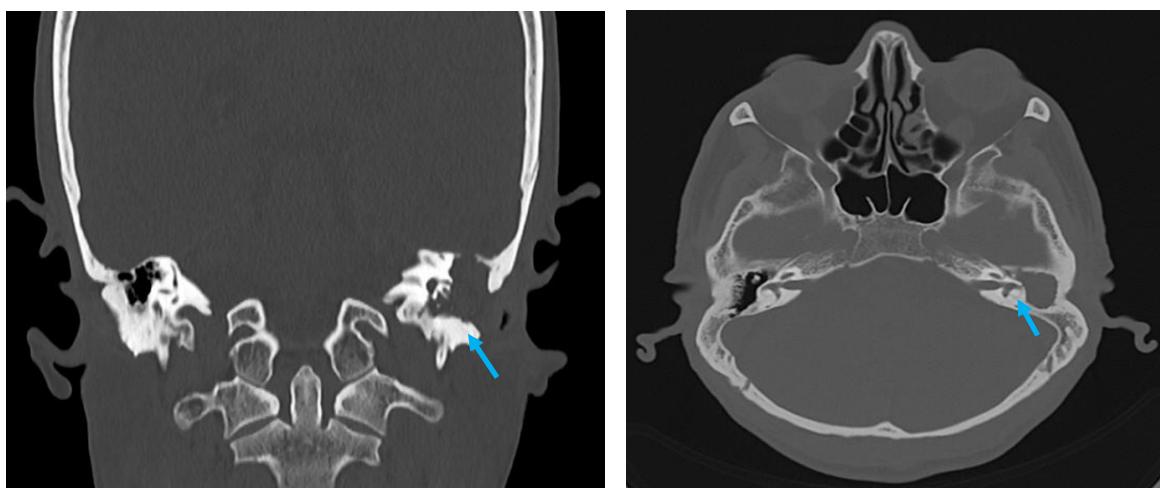
#### 1.8.2.1.2. Ostali klinički otorinolaringološki pregled

Zbog bliskog anatomskega odnosa srednjeg uha s farinksom, tonsilarnim tkivom i sinonazalnim kompleksom, osim uzimanja anamnestičkih podataka, neophodno je sprovesti detaljan rinoskopski i orofaringoskopski pregled. Hronična oboljenja nosa, sinusa, ždrijela i krajnika, devijacija nosne pregrade, prisustvo atopizma, sistemskih i opštih oboljenja u značajnoj mjeri mogu da utiču na poremećaj funkcije Eustahijeve tube. Opstrukcije nosa različite etiologije utiču na poremećaj pneumatizacije srednjeg uha, što ima za posljedicu nastanak recidiva holesteatoma. Dokazano je da operacija devijacije nosne pregrade dovodi do poboljšanja funkcije Eustahijeve tube i pozitivno prognostički utiče na ishod operativnog liječenja srednjeg uha. Ispitivanje kranijalnih nerava s naglaskom na facialni nerv bi takođe trebalo sprovesti [32, 40].

#### 1.8.2.2. Radiološka dijagnostika

Klasična radiografska ispitivanja (RTG pregled mastoida po Schuller-u i piramide po Stenwars-u) se danas sve rjeđe koriste u dijagnostici holesteatoma. Kompjuterizovana

tomografija (KT) i magnetna rezonanca (MR) s visokom rezolucijom, programima za izdvojeno prikazivanje koštanih struktura i finim diferenciranjem mekotkivnih struktura, revolucionarno su izmjenile radiološku dijagnostiku i evaluaciju otoloških oboljenja. KT pregled temporalne kosti kod holesteatoma srednjeg uha, osim njegovog prisustva, lokalizacije i ekstenzivnosti, karakteriše hipopneumatizacija ili sklerozacija *mastoida* s osteodestrukcijom koštanih zidova spoljašnjeg slušnog kanala, kavuma timpani, mastoida, sigmoidnog sinusa, facijalnog kanala i labirinta. Kod *atik* holesteatoma osikule su dislocirane medijalno i *skutum* je destruisan. Na aksijalnim presjecima kod *pars tensa* holesteatoma, prisutna je proširenost u lateralni atik, *aditus ad antrum*, prostor iza inkusa i dislokacija osikula. Kod ekstenzivnijih formi uslijed izražene osteolize, često su prisutne dehiscencije u području tegmena atika, kanalu facijalnog nerva i sigmoidnog sinusa, kao i fistule na lateralnom polukružnom kanalu i promontorijumu (Slika 11).



**Slika 11.** KT temporalne kosti (koronalni i aksijalni presjek): lijevi kavum timpani deformisan i izraženo proširen, u cijelini ispunjen holesteatomom, koji ekstendira u spoljašnji slušni hodnik i mastoidni kavum; maleus i inkus destruisani; tegmen timpani diskontinuiran – komunikacija sa endokranijalnim prostorom; diskontinuiran lateralni zid lateralnog semicirkularnog kanala – fistula ostvaruje kontakt sa srednjim uhom.

Prednosti MR dijagnostike u dijagnostici holesteatoma imaju značaj kod sumnje na razvoj ili prisustvo intrakranijalne otogene komplikacije gdje se preciznije može procijeniti intrapetrozna i/ili ekstrapetrozna proširenost mekotkivnih struktura i direktno vizualizirati facijalni i vestibulo-kohlearni nerv, endokranijalne i vaskularne strukture (Slika 11) [32, 39, 54, 165].

#### 1.8.2.3. Audiološka dijagnostika

U audioloskoj dijagnostici holesteatoma srednjeg uha standardnu proceduru čini tonalna liminirana audiometrija. Najznačajnije kliničke parametre u preoperativnoj procjeni i

postoperativnoj evaluaciji slušne funkcije čine prosječni prag sluha i "vazdušno-koštani zjap". Prosječni prag sluha (eng. *PTA*; *pure tone average*) se temelji na prosječnoj vrijednosti praga sluha za vazdušnu provodljivost na četiri frekvencije 0,5, 1, 2 i 4 kHz, dok se razlika između prosječne vrijednosti praga sluha za vazdušnu i koštanu provodljivost na tri frekvencije 0,5 Hz, 1 kHz i 2 kHz, označava kao "vazdušno-koštani zjap" ili "vazdušno-koštana pukotina" (eng. *ABG*; *air-bone gap*) [167, 168].

Obično je prisutno konduktivno oštećenje sluha različitog stepena, zavisno od stepena proširenosti bolesti i dužine trajanja oboljenja. Progresijom oboljenja i većim stepenom oštećenja konduktivnog aparata, konduktivna nagluvost se transformiše u mješovito, a potom u senzorineuralno oštećenje zbog toksičnog efekta medijatora inflamacije na unutrašenje uho. Umjereni konduktivni deficit viši od 40 dB ukazuje na diskontinuitet osikularnog lanca, obično u području dugog kraka inkusa i suprastruktura stapesa. Kod ekstenzivnijih formi bolesti, nekada može biti prisutno blago konduktivno oštećenje sluha jer holesteatom može direktno provoditi zvučnu energiju na suprastrukture ili bazalnu ploču stapesa, čineći fenomen takozvane prirodne miringostapediopeksije ili kolumela efekat. Vestibularno ispitivanje se provodi testovima ortostatike, ispitivanjem spontanog nistagmusa, testom perilimfne fistule labirinta, *head shaking* i *head impuls* testom i kalorijskim ispitivanjem toplim vazduhom. Kalorijski test pokazuje najčešće hipotoniju labirinta na strani oboljelog labirinta [54, 165].

#### **1.8.2.4. Mikrobiološka dijagnostika**

S obzirom na blisku vezu izmedju agresivnih karakteristika holesteatoma i recidivirajućih bakterijskih superinfekcija vrlo je vazno detaljno sagledavanje bakterioloških uzročnika, naročito na polju adekvatne restitucije postoperativne rane, redukcije agresivnog potencijala holesteatoma i sprječavanja pojave komplikacija. Konvencionalni brisevi uha, uzeti pod direktnom kontrolom ambulantnog ili operativnog mikroskopa, pouzdani su u uspostavljanju preoperativnog mikrobiološkog profila. Među najčešće izolovanim bakteriološkim sojevima kod holesteatoma srednjeg uha su *Pseudomonas aeruginosa* (51%), *Staphylococcus aureus* (31%) i *Proteus species* (17%). Posebnu pažnju u postoperativnom toku treba posvetiti prevenciji intrahospitalne infekcije rezistentnim sojevima, među kojima prednjače sojevi *Pseudomonas aeruginosa* [169, 170].

## **1.9. Terapija holesteatoma srednjeg uha**

### **1.9.1. Konzervativna terapija holesteatoma srednjeg uha**

Konzervativna terapija kod holesteatoma srednjeg uha ne omogućava potpuno izlječenje i nije terapija izbora kod ove bolesti. Upotreba empirijske antibiotičke terapije se preporučuje kod potencijalne infekcije sa bakterijom *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i anaerobnim uzročnicima i prije dobijanja rezultata mikrobiološke analize brisa sekreta uha na biogram i antibiogram. Najefikasniji u suzbijanju infekcije su antibiotici iz reda fluorohinolona (*Ciprofloxacin*, *Levofloxacin*) [162, 170]. Lokalna aplikacija antibiotsko-steroidnih kapi kod pacijenata sa znakovima akutne infekcije, poput sekrecije iz uha, može da redukuje pojavu inflamacije i granulacionog tkiva. Značaj konzervativne terapije se ogleda u kontroli preoperativnih infekcija ili inflamacija i eradicaciji postoperativnih komplikacija [45, 171].

### **1.9.2. Hirurška terapija holesteatoma srednjeg uha**

Hirurško liječenje holesteatoma srednjeg uha je terapija izbora i podrazumijeva primjenu dvije bazične tehnike timpanoplastike s modifikacijama [12]:

- a) zatvorena tehnika s očuvanim zadnjim koštanim zidom spoljašnjeg slušnog kanala (eng. *CWU - canal wall-up*),
- b) otvorena tehnika s uklonjenim zadnjim koštanim zidom spoljašnjeg slušnog kanala (eng. *CWD - canal wall-down*),
- c) timpanomastoidektomija (*radikalna mastoidektomija*).

Izbor hirurških tehnika ostaje kontroverzan i obično se odlučuje na osnovu prisustva ili odsustva holesteatoma, njegove lokalizacije i proširenosti, stanja sluznice srednjeg uha i stepena oštećenja sluha [172]. Otvorena tehnika timpanoplastike je metoda izbora u liječenju hronične upale srednjeg uha s holesteatomom [173]. Stanković i saradnici navode da su slabiji preoperativni nalaz sluha, primjena otvorene tehnike, mlađa dob, bilateralni holesteatom, oštećenje oskularnog lanca, kao i revizione operacije direktno povezani sa slabijim funkcionalnim rezultatima nakon hirurškog tretmana. Autori smatraju da je zatvoreni tip timpanoplastike tehnika izbora za atik i sinus tympani holesteatom, dok za *tensa* holesteatom više preporučuju otvoreni tip tehnika [174, 175].

Vartiainen i saradnici navode da 71% recidivirajućih holesteatoma čine rezidualni holesteatomi i da se pravilnim izborom hirurške tehnike za vrijeme prvog operativnog akta njihova učestalost može smanjiti i za 50% [176]. Mercke navodi da učestalost rekurentnog

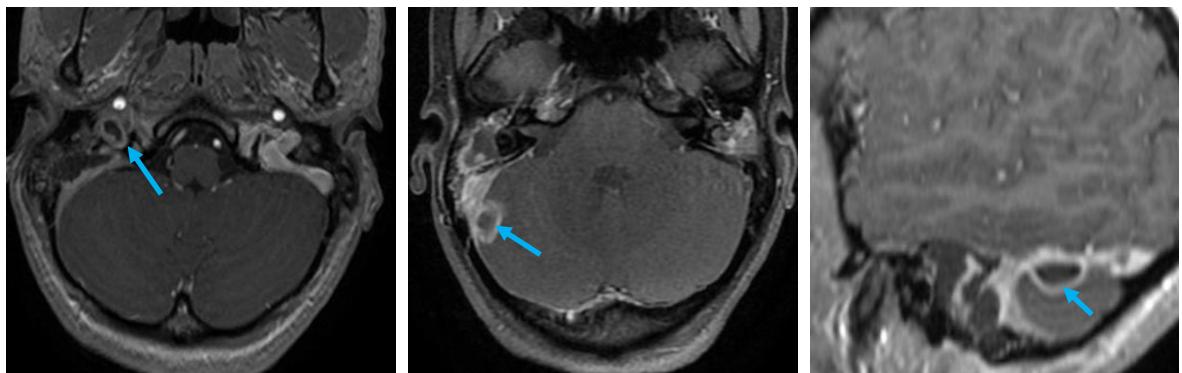
holesteatoma kod zatvorene tehnike, tokom prve postoperativne godine, iznosi 37,5% i da se ona vremenski linearno povećava [177]. Cook i saradnici su izvijestili da modifikovana radikalna mastoidektomija pruža relativno siguran hirurški pristup za uklanjanje hronične bolesti srednjeg uha i mastoida i daje reproducibilne rezultate [178].

Timpanoplastika u dva akta kod holesteatoma srednjeg uha je indikovana kada se tokom prvog akta daje prioritet kompletnoj ekskiziji patološkog procesa, dok se rekonstrukcija osikularnog lanca i restitucija slušne funkcije prolongira za takozvani "seconde stage" ili drugi akt. "Seconde stage" hirurgija je obavezna s ciljem isključivanja rezidualnog ili recidivantnog holesteatoma, s obzirom na to da klinički i otoskopski pregledi nisu pouzdani prediktori za ovu indikaciju [179, 180]. Sanna i saradnici ističu da prezervacija sluznice srednjeg uha i rekonstrukcija defekta skutuma, kao i pneumatskog prostora čine glavne principe u hirurškoj eradikaciji recidiva holesteatoma. [181].

Arsović i saradnici, istražujući povezanost pojedinih tipova hirurških tehnika s pojavom postoperativnih recidiva holesteatoma, ističu da tokom prvih godina dominira pojava rezidualnog, a kasnije (8-15 godina) recidivirajućeg holesteatoma. Autori su dokazali statistički značajno manju incidencu recidiva holesteatoma nakon primjene otvorene tehnike timpanoplastike [182].

## 1.10. Komplikacije holesteatoma srednjeg uha

Zbog izrazito agresivnih osteodestruktivnih karakteristika, holesteatom je u preko 80% slučajeva odgovoran za nastanak, nekada po život opasnih, egzokranijalnih i endokranijalnih otogenih komplikacija. Stoga je veoma važno proučavanje mehanizama putem kojih stečeni holesteatom dovodi do destrukcije kosti [2, 3]. Tipični stečeni holesteatom srednjeg uha, povezan s hroničnom upalom srednjeg uha, može dovesti do koštane resorpcije temporalne kosti, destrukcije osikularnog lanca i otičke kapsule, fistule labirinta, infiltracije mastoidnog nastavka, pareze ili paralize facijalnog nerva, dubokih apscesa na vratu, konduktivne i senzorineurale nagluvosti, vestibularne disfunkcije, neuropatija, sistemske infekcije, hroničnog bola i izmijenjenog mentalnog statusa. Ostale endokranijalne komplikacije uključuju trombozu lateralnog sinusa, meningitis, meningoencefalitis, cerebralni apses u temporalnoj i parijetalnoj regiji i cerebelarni ekstraduralni apses (Slika 12) [1, 68].



**Slika 12.** MR endokranijuma ( $T1W+C$ , aksijalni i sagitalni prikaz): epiduralni apses na konveksitetu desne hemisfere malog mozga: desni sigmoidni sinus bez normalne opacifikacije i dilatiran zbog sadržaja tromba: erozija prednjeg zida i komunikacija s desnim mastoidnim nastavkom i srednjim uhom, koji su ispunjeni granulacionim tkivom.

### 1.11. Prognoza holesteatoma srednjeg uha

Oko 10% hroničnih upalnih procesa srednjeg uha u dječjem uzrastu su udruženi s pojavom holesteatoma [4]. Postoperativne komplikacije i recidivi su češći kod stečenog u odnosu na kongenitalni holesteatom. Najznačajniji pozitivni prognostički faktor čini rana detekcija oboljenja, a preporuke pojedinih autora ukazuju da bi stopa recidiva trebalo da bude manja od 10% [11, 13, 183, 184]. Klinička i otoskopska/otomikroskopska dijagnoza rezidualne ili rekurentne bolesti nakon zatvorene tehnike timpanoplastike je nepouzdana, pa je prije obavezne "second-look" operacije indikovana kompjuterizovana tomografija visoke rezolucije i konvencionalna ili magnetna rezonanca s kontrastom [185]. Postoperativna evaluacija je obavezna zbog rizika od nastanka infekcije, stenoza i recidiva holesteatoma [186]. Pojedine preporuke nalažu praćenje tokom cijelog života zbog visoke incidence odgođenog recidiva [180]. Dokazane faktore rizika za pojavu postoperativnog recidiva oboljenja uključuju lokalizacija holesteatoma u zadnjem mezotimpanonu, diskontinuitet osikularnog lanca nakon odstranjivanja patološkog procesa, nedovoljno iskustvo otohirurga i nepotpuno uklanjanje patološkog procesa [187].

## **2. HIPOTEZA RADA**

Postavljene su sljedeće hipoteze rada:

1. Stepen ekspresije faktora nekroze tumora alfa, interleukina 1 i matriks metaloproteinaze 9 je statistički značajno veći u perimatriksu stečenog holesteatoma srednjeg uha.
2. Stepen ekspresije faktora nekroze tumora alfa, interleukina 1 i matriks metaloproteinaze 9 ima statistički značajan uticaj na progresiju osteodestruktivnog procesa kod stečenog holesteatoma srednjeg uha.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Osnovni cilj istraživanja je bio:

1. Ispitati i uporediti ekspresiju faktora nekroze tumora alfa, interleukina 1 i matriks metaloproteinaze 9 u ćelijama perimatriksa stečenog holesteatoma i inflamirane sluznice srednjeg uha.

Bliži ciljevi istraživanja su bili:

2. Uporediti ekspresiju pomenutih imunohistohemijskih pokazatelja koji upućuju na agresivne karakteristike stečenog holesteatoma srednjeg uha sa sljedećim kliničkim parametrima:
  - destrukcijom osikularnog lanca, koštanih zidova spoljašnjeg slušnog kanala, kavuma timpani i susjednih anatomske struktura,
  - ostalim patomorfološkim promjenama anatomskih struktura srednjeg uha,
  - mikrobiološkim nalazom,
  - upotreboom antibiotske terapije,
  - nalazom slušne funkcije,
  - stepenom i dužinom trajanja hroničnog upalnog procesa srednjeg uha,
  - demografskim podacima,
  - morfološkim karakteristikama palatinalnih tonzila.

## **4. MATERIJAL I METODE**

### **4.1. Materijal**

#### **4.1.1. Ispitanici i mjesto ispitivanja**

Istraživanje predstavlja prospективnu studiju kojom je obuhvaćeno 178 ispitanika oba pola, operativno tretiranih zbog hronične upale srednjeg uha u Klinici za bolesti uha, grla i nosa, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske, Banja Luka, u periodu od 2014. do 2018. godine. Imunohistohemijska analiza intraoperativno uzetih fragmenata tkiva je sprovedena u Zavodu za kliničku patologiju, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske, Banja Luka.

#### **4.1.2. Selekcija ispitanika**

Ispitanici su podijeljeni u dvije grupe:

a) Eksperimentalna grupa:

- 97 ispitanika oba pola, sa hroničnom upalom srednjeg uha i stečenim holesteatomom (uzorak uzet biopsijom iz fragmenata perimatriksa stečenog holesteatoma srednjeg uha).

b) Kontrolna grupa:

- 81 ispitanik oba pola, sa hroničnom upalom srednjeg uha bez stečenog holesteatoma (uzorak uzet biopsijom iz fragmenata inflamirane sluznice srednjeg uha).

Kriterijumi za uključivanje ispitanika u istraživanje:

- potvrđena dijagnoza hronične upale srednjeg uha sa ili bez stečenog holesteatoma, prisustvo matriksa i perimatriksa stečenog holesteatoma
- pismena saglasnost ispitanika za učešće u istraživanju.

Kriterijumi za isključivanje ispitanika iz istraživanja:

- a) potvrđena dijagnoza kongenitalnog holesteatoma,
- b) akutne infekcije gornjih respiratornih puteva,
- c) imunodeficijentna stanja,
- d) maligni tumori srednjeg uha,

- e) odsustvo matriksa i perimatriksa holesteatoma,
- f) neadekvatno tehnički uzeti i pripremljeni uzorci za imunohistohemijsko ispitivanje,
- g) ispitanici bez pismene saglasnosti za učešće u istraživanju.

## 4.2. Metode rada

Dijagnoza hronične upale srednjeg uha je postavljena na osnovu na anamneze, kliničkog otorinolaringološkog pregleda, audiološke, mikrobiološke i radiološke dijagnostike. Neposredno po prijemu ispitanika u kliniku, zabilježeni su detaljni anamnestički podaci na bazi strukturisanog upitnika s posebnim osvrtom na karakteristike otološke simptomatologije (bol u uhu, sekrecija iz uha, nagluvost, šumovi u uhu, vrtoglavica, glavobolja). Anamnestički su posebno ispitani:

- a) vremenski interval od pojave prvih simptoma do postavljanja dijagnoze hronične upale srednjeg uha,
- b) vremenski interval od postavljanja dijagnoze hronične upale srednjeg uha do datuma prijema ispitanika zbog indikovanog otohirurškog liječenja.

Takođe su detaljno ispitani podaci o upotrebi, vrsti i vremenskom ordiniranju antibiotske terapije zbog hronične upale srednjeg uha.

### 4.2.1. Instrumenti mjerena

#### 4.2.1.1. Klinički ORL pregled

Klinički ORL pregled je obuhvatao sljedeće dijagnostičke procedure:

- a) otoskopija i/ili otomikroskopija,
- b) prednja rinoskopija,
- c) orofaringealni pregled,
- d) pregled vrata.

#### 4.2.1.2. Klinička procjena veličine palatinalnih tonzila

Klinička procjena veličine palatinalnih tonzila je kategorisana prema "skali 0-4" [188]:

- *Gradus 0*: palatinalne tonzile unutar tonsilarne jame,
- *Gradus 1*: palatinalne tonzile opstruišu < ,=25% *isthmus faucium*-a,
- *Gradus 2*: palatinalne tonzile opstruišu 26 do <50% *isthmus faucium*-a,
- *Gradus 3*: palatinalne tonzile opstruišu 51 do <75% *isthmus faucium*-a,
- *Gradus 4*: palatinalne tonzile opstruišu više od 75% *isthmus faucium*-a.

Ispitana je ekspresija faktora nekroze tumora alfa, interleukina 1 i matriks metaloproteinaze 9 u odnosu na morfološke karakteristike palatinalnih tonzila i tip hroničnog upalnog procesa tonzilarnog tkiva (hronični atrofični i hronični hipertrofični tonsilitis).

#### 4.2.1.3. Mikrobiološka i radiološka dijagnostika

Mikrobiološka dijagnostika je bazirana na rezultatima analize uzetog brisa sekreta iz uha. Kod ispitanika s dijagnostikovanim holesteatomom srednjeg uha korištena je dodatna radiološka dijagnostika, koja je uključivala kompjuterizovanu tomografiju (KT) temporalne kosti, a u pojedinim slučajevima i magnetnu rezonancu (MR) endokranijuma.

#### 4.2.1.4. Audiološka dijagnostika

Standarno kliničko ispitivanje sluha tonalnom liminarnom audiometrijom je sprovedeno kod svih ispitanika preoperativno (vremenski interval < tri mjeseca) i postoperativno nakon šest mjeseci. Vrijednost prosječnog praga sluha (eng. *PTA - Pure Tone Average*) u decibelima (*dB*) je izračunata na nivou četiri audiometrijske govorne frekvencije: 500 Hz, 1 kHz, 2 kHz i 4 kHz. Vrijednost vazdušno-koštanog zjapa, pukotine ili gep-a (eng. *ABG - Air Bone Gap*) u decibelima (*dB*) je izračunata kao razlika između praga sluha za vazdušnu i praga sluha za koštanu provodljivost, na nivou tri audiometrijske govorne frekvencije: 500 Hz, 1 kHz i 2 kHz. Za izračunavanje vrijednosti postoperativnog poboljšanja praga sluha su korišteni kriterijumi prema preporukama *Japanskog komiteta za kliničku otologiju* [166]:

1. kriterijum - udio pacijenata s postoperativnim pragom sluha < 40 dB,
2. kriterijum - poboljšanje prosječnog praga sluha > 15 dB,
3. kriterijum - postoperativni vazdušno-koštani gep < 20 dB.

Dobijeni audiometrijski podaci su interpretirani u skladu sa smjernicama koje je objavio Odbor za sluh i ravnotežu Američke akademije za otorinolaringologiju i hirurgiju glave i vrata (*Committee on Hearing and Equilibrium, The American Academy of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation*) (Slika 13) [167]:



**Slika 13. Stepen oštećenja sluha u decibelima (dB): kategorizacija prema smjernicama Odbora za sluh i ravnotežu Američke akademije za otorinolaringologiju i hirurgiju glave i vrata, 1995. godine [167].**

#### **4.2.1.5. Mikrohirurški operativni zahvat**

##### **4.2.1.5.1. Preoperativna priprema ispitanika i operativnog polja**

Neposredno prije operativnog zahvata, ispitaniku je ordinirana profilaktička sistemska antibiotska (*Cefazolin a 1g 3x1 iv*) i antikoagulantna terapija (*niskomolekularni heparin a 1750 ij sc; 2 h prije i 12 h nakon operativnog zahvata kod ispitanika starijih od 35 godina*). Operativni zahvat je sproveden u opštoj endotrahealnoj anesteziji. Lokalno je apliciran antibiotik (*Chloramphenicol, unguentum*) u području *rime oculi* oba oka, koja se potom prekriju tuferima od gaze zbog prevencije erozije rožnjače. Potom je urađena toaleta operativnog polja (*koža prethodno obrijanog kosmatog dijela retroaurikularne regije i koža spoljašnjeg slušnog kanala uha*) sa sterilnim rastvorom 70% etanola. Tokom mikrohirurške procedure korišteni su: *hirurški i specijalni mikrohirurški instrumentarijum, operativni mikroskop, aspiraciona i irrigaciona pumpa i različiti tipovi i vrste freza*.

##### **4.2.1.5.2. Mikrohirurška operativna procedura**

Nakon prethodno učinjene instilacije rastvora adrenalina (omjer 1:200 000) u područje kože spoljašnjeg slušnog kanala i retroaurikularne regije, učini se lučna retroaurikularna incizija kože. Dijelom tupom i dijelom oštom preparacijom se pristupi zadnjoj koštanoj ivici spoljašnjeg slušnog kanala. Ispreparira se dio duboke fascije temporalnog mišića za neomembranu. Prikaže se *spina supraventricularis*. Koža zadnjeg, gornjeg i donjeg zida se preparira sve do *anulus tympanicus-a*. Učini se vertikalni rez na sredini kože zadnjeg zida spoljašnjeg slušnog kanala, a potom odigne timpanomeatalni režanj.

Zavisno od vrste i stepena hroničnog upalnog procesa srednjeg uha, primjenjivane su, osim standardne (*timpanoplastika tip I - miringoplastika*), sljedeće tehnike timpanoplastike s modifikacijama [31]:

- a) zatvorena tehnika (eng. *CWU - canal wall-up*),
- b) otvorena tehnika (eng. *CWD - canal wall-down*),
- c) timpanomastoidektomija (*radikalna mastoidektomija*).

##### **4.2.1.5.3. Intraoperativna eksploracija i biopsija**

Tokom sproveđenja mikrohirurškog operativnog zahvata, biopsijom su uzimani uzorci iz fragmenata perimatriksa holesteatoma (eksperimentalna grupa) i inflamirane sluznice srednjeg uha (kontrolna grupa) i odlagani u *10% formalinu* za histološku i imunohistohemijsku analizu. Intraoperativnom eksploracijom su ispitivane patomorfološke promjene na anatomskim strukturama srednjeg uha: tip i podtip perforacije membrane timpani, retrakcija membrane timpani, stanje sluznice kavuma timpani, stanje timpanalnog

ušća Eustahijeve tube, tip, lokalizacija i proširenost holesteatoma, stanje osikularnog lanca i pojedinih slušnih koščica, stanje koštanih zidova spoljašnjeg slušnog hodnika, kavuma timpani kao i susjednih anatomske strukture s aspekta prisustva ili odsustva koštane destrukcije (koštani kanal facijalnog nerva i sigmoidnog sinusa, prisustvo fistule na promontorijumu i lateralnom polukružnom kanalu, denudirana tvrda moždana ovojnica srednje i zadnje lobanjske jame).

Klasifikacija prema stepenu destrukcije osikularnog lanca je sprovedena intraoperativno na sljedeće kategorije (modifikacija prema *Wullstein-u i Austin-u*) [37, 189, 190]:

- a) O<sub>0</sub> - intaktan osikularni lanac,
- b) O<sub>1</sub> - erodiran inkus sa diskontinuitetom osikularnog lanca,
- c) O<sub>2</sub> - erodiran inkus i suprastruktura stapesa,
- d) O<sub>3</sub> - manubrium maleusa i inkus nedostaju, erodirane suprastruktura stapesa.

#### **4.2.1.5.4. Postoperativna evaluacija**

Postoperativno je, zavisno od tipa i ekstenzivnosti hroničnog upalnog procesa srednjeg uha, peroralno ordiniran antibiotik širokog spektra dejstva, prema već usaglašenom kliničkom terapijskom protokolu tokom tri dana, kao i simptomatska terapija (analgetici, infuzione otopine, antiemetici) prema potrebi. Prva postoperativna kontrola je sprovedena sedmi, a druga četrnaesti dan u otomikroskopskom kabinetu, kada su skidani šavovi i detamponiran spoljašnji slušni kanal i/ili trepanacioni kavitet.

#### **4.2.1.6. Histološka analiza**

Fragmenti tkiva dobijeni biopsijom (perimatriks holesteatoma i inflamirana sluznica srednjeg uha) su fiksirani u *10% neutralnom puferovanom formalinu* i obrađeni konvencionalnom histološkom tehnikom u *histokinetu Leica TP 1020 (Leica Microsystems)*. Nakon fiksacije u *formalinu*, dehidracije u rastućim koncentracijama *etanola*, bistrenja u *ksilolu* i prožimanja tečnim parafinom tkivni fragmenti su ukalupljeni u parafinske blokove. Za histološku i imunohistohemijsku analizu parafinski blokovi su rotacionim mikrotomom (*microTec CUT 4055, SLEE MAINZ*) sječeni na rezove debljine 4 -5 µm. Dobijeni rezovi su za histološku analizu montirani na standardna predmetna stakalca i sušeni u termostatu na 68°C najmanje 30 minuta, zatim deparafinisani, rehidrirani, obojeni standardnom metodom *hematoksilin-eozin (HE)* i pregledani svjetlosnim mikroskopom (*Leica DM 2500*).

#### **4.2.1.7. Imunohistohemijska analiza**

Tokom mikrohirurškog operativnog zahvata biopsijom su uzeti uzorci fragmenta tkiva srednjeg uha. Bioptat u eksperimentalnoj grupi je uzet iz perimatriksa holesteatoma, a u kontrolnoj iz inflamirane sluznice sljedećih anatomskeih struktura srednjeg uha: kavuma timpani, mukoznog sloja membrane timpani, *antrum-a i aditus ad antrum-a*.

##### **4.2.1.7.1. Priprema za imunohistohemijsko bojenje**

Za imunohistohemijsku analizu dobijeni parafinski rezovi su montirani na pozitivno naelektrisana stakalca *SuperFrost Plus (Menzel-glaser)* i sušeni na 70°C najmanje dva sata. Nakon toga su deparafinisani i rehidrirani. Postupak za ručnu deparafinizaciju i rehidraciju je bio sljedeći:

- a) ispiranje u *ksilolu* (2x5 minuta),
- b) uranjanje u 100% *etanol* (2x5 minuta),
- c) uranjanje u 96% *etanol* (2x5 minuta),
- d) uranjanje u 70% *etanol* (5 minuta),
- e) ispiranje u destilovanoj vodi (10 minuta).

Nakon rehidratacije, imunohistohemijsko bojenje je nastavljeno blokiranjem aktivnosti *endogenih peroksidaza* i topotnim oporavkom antiga (engl. *HIER - Heat-induced epitope retrieval*). Enzimska aktivnost je blokirana inkubacijom tkiva u 3% *vodenom rastvoru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*, (10-minuta na sobnoj temperaturi ), a topotni oporavak antiga zagrijavanjem tkiva u *citratnom puferu pH 6.0* (20 minuta na 98°C) u PT modulu (eng. *PreTreatment Module™ Thermo Scientific, USA*). Nakon "kuvanja" tkivo je ohlađeno na sobnoj temperaturi, a citratni pufer ispran destilovanom vodom. Da bi se spriječilo nespecifično bojenje pozadine i/ili da bi se smanjilo nespecifično vezivanje *endogenih IgG* u toku imunološke reakcije, rezovi tkiva su neposredno prije aplikacije specifičnih antitijela dodatno inkubirani sa komercijalnim proteinskim blokom (*Ultra V Block, Product# TA-125-UB, Thermo Fisher Scientific, USA*) pet minuta na sobnoj temperaturi, bez ispiranja.

##### **4.2.1.7.2. Imunohistohemijsko bojenje**

Imunohistohemijska detekcija antiga, izazvana ciljnim vezivanjem njihovih epitopa sa specifičnim primarnim antitijelima, je izvedena reakcijom *peroksidaze* prema uputstvima proizvođača (*Lab Vision Corporation/Neo Markers, Fremont, USA*). Primijenjena su komercijalna antitijela sintetizovana iz miša (*MMP9*) i zeca (*TNF-R2 i IL-1*).

U istraživanju su korišteni:

- a) mišje anti - MMP9 monoklonalno antitijelo (MMP9 Monoclonal Antibody, Clone 2C3, Product# MA1-12894, Invitrogen, Thermo Fisher, USA),
- b) zečje anti - TNF-R2 poliklonalno antitijelo (TNFR2 Polyclonal Antibody, Product#PA1-21148, Thermo Fisher, USA ),
- c) zečje anti - IL-1 poliklonalno antitijelo (IL-1 alpha Polyclonal Antibody, Product# PA5-25921, Invitrogen, Thermo Fisher, USA).

Antitijela su primijenjena u odgovarajućim razrjeđenjima (1:100 za mišje monoklonalno antitijelo MMP9; 1:50 za zečja poliklonalna antitijela TNF-R2 i IL-1 ). Razrjeđenja su pripremljena uz pomoć komercijalnog diluenta (UltraClean Ab Diluent, Product# TA-125-UC, Lab Vision, Thermo Scientific, USA). Optimalne vrijednosti titra su aplicirane na tkiva, a inkubacija je obavljena preko noći u frižideru (u vlažnoj komori na temperaturi od 4°C). Po isteku inkubacije, naredni dan, višak antitijela je ispran TBS puferom (Tris buffered saline; pH 7,6), a vizuelizacija obavljena pomoću " ready to use" detekcionog sistema (UltraVision LP Detection system: HRP polymer & DAB Plus Chromogen, Product# TL-125-HD).

Detekcioni sistem je baziran na *dekstranskom polimeru* za koji su vezana sekundarna antitijela i *enzimi/HRP*. Na taj način povećana je osjetljivost metode, a pozadinsko bojenje je svedeno na minimum. U prvom koraku vizuelizacije, tkiva su inkubirana sa pojačivačem primarnog antitijela (10 minuta), a zatim *HRP polimerom* (15 minuta); oba na sobnoj temperaturi. Kompleks antigena i antitijela postao je vidljiv dodatkom *hromogena 3,3'-diaminobenzidina (DAB)* koji oksidira u prisustvu *peroksidaze* i stvara smeđe depozite (svi reagensi su firme *Thermo Fisher Scientific Fermen*t, USA). Nakon ispiranja *hromogena*, rezovi tkiva su kratko kontrastirani *Maier-ovim hematokilinom* u cilju vizuelizacije ostalih struktura tkiva.

Potom su rezovi tkiva, nakon ispiranja *hematoksilina*, dehidrirana u rastućoj koncentraciji *etanola* (70%, 90%, 100%), bistrena u *ksilolu* i trajno uklapana u *kanada balzam*. Za kontrolisano praćenje imunohistohemijske reakcije (pozitivna i negativna kontrola) poštovane su preporuke proizvođača. Za kontrolisanje pozitivne (specifične) reakcije bojenja MMP-9 korišteno je tkivo kolona, za TNF-R2 tkivo karcinoma jetre, a za IL-1 tkivo karcinoma pluća. Za kontrolu nespecifičnog bojenja (negativna kontrola) na tkivo je apliciran *TBS pufer* zbog čega se u kontrolnim presjecima tkiva zbog izostavljanja primarnog antitijela nije mogla naći nikakva imunološka aktivnost.

#### **4.2.1.7.3. Ekspresija imunohistohemiskog bojenja**

U imunohistohemijski obrađenim tkivima posmatran je intenzitet ekspresije u svakom pojedinom uzorku, dok je analiza imunohistohemiskih reakcija izvršena svjetlosno-mikroskopski, kvalitativnom, semikvantitativnom i za pojedina antitijela kvantitativnom analizom. Analiza reakcije imunohistohemije je bazirana na kvantitativnom (0-odsutan, 1-prisutan) i semikvantitativnom određivanju intenziteta bojenja putem svjetlosnog mikroskopa sistemom gradacije od 0-3:

- a) 0 - odsutna ekspresija,
- b) 1 - ekspresija slabog intenziteta,
- c) 2 - ekspresija umjerenog intenziteta,
- d) 3 - ekspresija visokog intenziteta.

Uzorci su u odnosu na procenat obojenih ćelija podijeljeni u četiri kategorije:

- a) 0 - nema obojenih ćelija → negativno,
- b) 1 -  $1 \leq 25\%$  obojenih ćelija → slabo pozitivno,
- c) 2 - 26 - 50% obojenih ćelija → umjeren pozitivno,
- d) 3 -  $>50\%$  obojenih ćelija → visoko pozitivno.

Određivanje pozitivnosti je vršeno na osnovu formule:

Ukupni rezultat ( $R$ ) = rezultat intenziteta  $\times$  rezultat postotka obojenih ćelija.

Na osnovu dobijenog ukupnog rezultata, izvršena je gradacija u četiri kategorije:

- a)  $R \leq 1$  - negativan (0),
- b)  $R \geq 2 \leq 3$  - slabo pozitivan (1+),
- c)  $R \geq 4 \leq 6$  - umjeren pozitivan (2+),
- d)  $R = 9$  - jako pozitivan (3+).

U konačnici su umjeren pozitivan ( $R=2+$ ) i jako pozitivan rezultat ( $R=3+$ ) sa sigurnošću smatrani pozitivnim.

### **4.3. Etički aspekti**

Preliminarni projekat istraživanja je odobrio Etički odbor Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske, Banjaluka, (rješenje broj: 01-10566-2/13). Nakon prijema u Kliniku, obavljen je detaljan razgovor s ispitanikom o operativnom zahvatu koji će biti sproveden, nakon čega ispitanik potpisuje posebno strukturisan informisani pristanak za mikrohirurške procedure na srednjem uhu. Potom je istraživač detaljno informisao ispitanika s ciljevima i razlozima kliničkog istraživanja uz obavezno prilaganje posebno strukturisane pisane forme obavještenja i formulara informativnog pristanka za ispitanike u kliničkom istraživanju.

### **4.4. Statistička analiza i prikaz podataka**

Kvalitativni podaci su prikazani kroz broj pojava i procentualnu zastupljenost. Za prikaz kvantitativnih podataka su korišteni pokazatelji deskriptivne statistike (broj ispitanika, aritmetička sredina, standardna devijacija, standardna greška aritmetičke sredine, ekstremne vrijednosti, kvartili, medijana i interval povjerenja za aritmetičku sredinu). Za upoređivanje razlika u učestalosti posmatranih obilježja prema različitim pokazateljima korišten je  $\chi^2$  test kontigencije. Normalnost raspodjele kod posmatranih obilježja je testirana *Kolmogorov-Smirnov*-im testom normalnosti. Za upoređivanje srednjih vrijednosti obilježja prema različitim grupama korišten je *Student*-ov *t* test za dva nezavisna uzorka i/ili ANOVA test za više nezavisnih uzoraka (ako posmatrana obilježja imaju normalnu raspodjelu) te neparametarski *Mann-Whitney U* test za dva nezavisna uzorka i/ili neparametarski *Kruskal-Wallis H* test za više nezavisnih uzoraka (ako posmatrana obilježja nemaju normalnu raspodjelu).

Kod korištenja *Student*-ovog *t* testa za nezavisne uzorke, značajnost razlike u varijansama posmatranih obilježja testirana je *F* testom. Za upoređivanje srednjih vrijednosti različitih obilježja korišten je *Student*-ov *t* test za uparene uzorke (ako posmatrana obilježja imaju normalnu raspodjelu), odnosno neparametarski *Wilcoxon*-ov test (ako posmatrana obilježja nemaju normalnu raspodjelu). Za utvrđivanje stepena povezanosti (korelacije) posmatranih obilježja korištena je *Pearson*-ova parametarska ili *Spearman*-ova neparametarska korelacija (u zavisnosti od normalnosti posmatranih obilježja).

Kao statistički značajne uzimane su vrijednosti u kojima je  $p < 0,05$ . Za statističku analizu te tabelarne i grafičke prikaze rezultata korišteni su sljedeći *software-i*: *IBM SPSS Statistics 21.0*; *MS Office Word 2010* i *MS Office Excel 2010*. Svi rezultati su predstavljeni tabelarnim prikazom i grafički (različiti pita, stubičasti i *box-plot* grafikoni).

## 5. REZULTATI

Istraživanje je obuhvatilo 178 ispitanika oba pola, u dobi između pet i 75 godina, operativno tretiranih zbog hronične upale srednjeg uha. Na osnovu prisustva stečenog holesteatoma srednjeg uha ispitanici su podijeljeni u dvije grupe: eksperimentalnu (97 ispitanika sa stečenim holesteatomom srednjeg uha) i kontrolnu (81 ispitanik bez prisustva stečenog holesteatoma srednjeg uha).

### 5.1. Medijatori inflamacije i demografske karakteristike ispitanika

#### 5.1.1. Starosna dob ispitanika

Starosna dob ispitanika se kretala od pet do 75 godina. Prosječna starosna dob ispitanika u ukupnom uzorku je iznosila 49 ( $SD \pm 17,06$ ), u eksperimentalnoj grupi 45 ( $SD \pm 18,72$ ), a kontrolnoj 54 godine ( $SD \pm 13,38$ ). Razlika u aritmetičkim sredinama starosne dobi između dvije grupe ispitanika se pokazala statistički značajnom ( $p < 0,01$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Prosječna starosna dob ispitanika

	Eksperimentalna grupa				Kontrolna grupa			
	N	M	SD	Medijana	N	M	SD	Medijana
Starosna dob	97	45,01	18,72	50,00	81	54,00	13,38	57,00

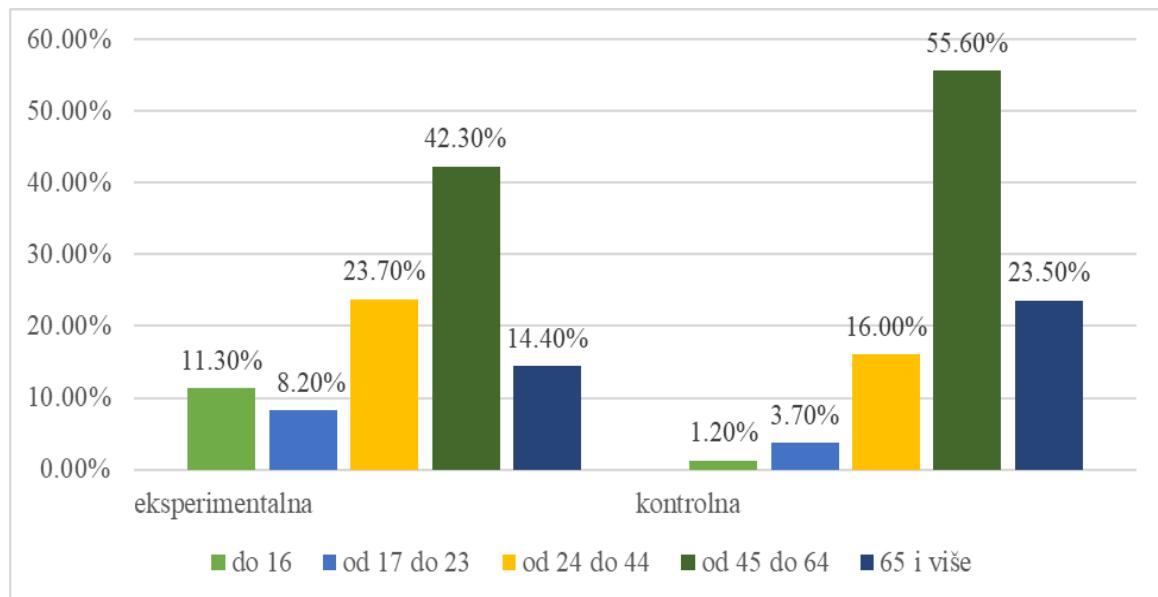
**Mann-Whitney U test:**  $U = 2910.00$ ,  $Z = -2,97$ ,  $p = 0,003$ ;  $p < 0,01$ , M-aritmetička sredina, SD-standardna devijacija

Rezultati  $\chi^2$  testa su pokazali da postoji statistički značajna razlika ( $p=0,011$ ,  $p<0,05$ ) u distribuciji ispitanika prema starosnim grupama između eksperimentalne i kontrolne grupe (Tabela 2). U eksperimentalnoj grupi su više bili zastupljeni ispitanici mlađe starosne dobi od kojih su u značajnom procentu od 11,3% pripadali starosnoj grupi do 16 godina (Slika 14).

**Tabela 2.** Ispitanici prema starosnim grupama

		Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
		N	1	
Starosne grupe	do 16	N	11	12
		%	11,3%	6,7%
	od 17 do 23	N	8	11
		%	8,2%	6,2%
	od 24 do 44	N	23	36
		%	23,7%	20,2%
	od 45 do 64	N	41	86
		%	42,3%	48,3%
	65 i više	N	14	33
		%	14,4%	18,5%
Ukupno		N	97	178
		%	100,0%	100,0%

**Chi-square test:**  $\chi^2=12,99$ ,  $p=0,011$ ;  $p<0,05$



**Slika 14.** Ispitanici prema starosnim grupama

### 5.1.1.1. Ekspresija TNF-R2 i starosna dob ispitanika

Primjenom *Kruskal-Wallis H* testa utvrđena je statistički značajna razlika starosne dobi ispitanika između eksperimentalne i kontrolne grupe u odnosu na stepen ekspresije TNF-R2. Ispitanici eksperimentalne grupe su imali statistički značajno ( $\chi^2=8,86$ ,  $p=0,003$ ;  $p<0,01$ ) nižu starosnu dob u odnosu na ispitanike kontrolne. Razlika starosne dobi između ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe u odnosu na stepen ekspresije TNF-R2 se pokazala statistički značajnom ( $\chi^2=9,14$ ,  $p=0,028$ ;  $p<0,05$ ), gdje su ispitanici sa slabo pozitivnom ekspresijom TNF-R2 imali statistički značajno veću starosnu dob u odnosu na ispitanike s jako pozitivnom ekspresijom (Tabela 3).

**Tabela 3.** Ekspresija TNF-R2 prema starosnoj dobi ispitanika

Grupa	Rezultat ekspresije TNF-R2	Dob		
		M	SD	N
Eksperimentalna	R ≤ 1 ; negativan (0)	51,17	18,42	12
	R ≥ 2 ≤ 3 ; slabo pozitivan (1+)	51,82	14,93	17
	R ≥ 4 ≤ 6 ; umjereni pozitivan (2+)	43,88	18,74	41
	R = 9 ; jako pozitivan (3+)	39,70	19,83	27
	Total	45,01	18,72	97
Kontrolna	R ≤ 1 ; negativan (0)	45,43	13,90	7
	R ≥ 2 ≤ 3 ; slabo pozitivan (1+)	56,07	14,87	29
	R ≥ 4 ≤ 6 ; umjereni pozitivan (2+)	54,51	12,03	39
	R = 9 ; jako pozitivan (3+)	50,67	12,36	6
	Total	54,00	13,38	81
Ukupno	R ≤ 1 ; negativan (0)	49,05	16,73	19
	R ≥ 2 ≤ 3 ; slabo pozitivan (1+)	54,50	14,87	46
	R ≥ 4 ≤ 6 ; umjereni pozitivan (2+)	49,06	16,62	80
	R = 9 ; jako pozitivan (3+)	41,70	19,02	33
	Total	49,10	17,06	178

**Kruskal-Wallis H test:**  $\chi^2=9,14$ ,  $p=0,028$ ;  $p<0,05$ , M-aritmetička sredina, SD-standardna devijacija

Ordinalna logistička regresija je utvrdila prediktivni uticaj prisustva holesteatoma u odnosu na starosne grupe, gdje je uočena statistički značajno veća vjerovatnoća ( $p<0,01$ ) prisustva holesteatoma kod ispitanika mlađe starosne dobi. U odnosu na stepen ekspresije TNF-R2, dokazana je statistički značajno veća vjerovatnoća ( $p<0,05$ ) da će ispitanici sa slabo pozitivnom ekspresijom TNF-R2 pripadati starijim starosnim grupama (Tabela 4).

**Tabela 4.** Ekspresija TNF-R2 prema starosnim grupama ispitanika

Prediktori	Beta	S.E.	Wald	df	p	95% C.I.	
						Donja granica	Gornja granica
Grupa – eksperimentalna	-,777	,302	6,611	1	,010**	-1,370	-,185
Grupa - kontrolna (konstanta)	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.
TNF-R2: Negativan (0)	,656	,537	1,491	1	,222	-,397	1,709
TNF-R2: Slabo pozitivan (1+)	1,017	,449	5,143	1	,023*	,138	1,896
TNF-R2: Umjeren pozitivan (2+)	,590	,392	2,265	1	,132	-,178	1,358
TNF-R2: Jako pozitivan (3+) (konstanta)	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.

\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , TNF-R2 - receptor tumora nekroze alfa, beta - standardni koeficijent parcijalne regresije, S.E. - standardna greška, C.I. - interval povjerenja

### 5.1.1.2. Ekspresija IL-1 i starosna dob ispitanika

Primjenom Kruskal-Wallis H testa nije utvrđena statistički značajna razlika starosne dobi između ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe prema stepenu ekspresije IL-1 (Tabela 5).

**Tabela 5.** Ekspresija IL-1 prema starosnoj dobi ispitanika

Grupa	Rezultat ekspresije IL-1	Dob		
		M	SD	N
Eksperimentalna	R ≤ 1 ; negativan (0)	45,17	17,04	12
	R ≥ 2 ≤ 3 ; slabo pozitivan (1+)	53,09	16,92	11
	R ≥ 4 ≤ 6 ; umjeren pozitivan (2+)	48,78	17,97	36
	R = 9 ; jako pozitivan (3+)	39,05	19,24	38
	Total	56,00	15,52	97
Kontrolna	R ≤ 1 ; negativan (0)	53,29	14,34	1
	R ≥ 2 ≤ 3 ; slabo pozitivan (1+)	53,07	13,57	7
	R ≥ 4 ≤ 6 ; umjeren pozitivan (2+)	54,64	13,55	28
	R = 9 ; jako pozitivan (3+)	45,17	17,04	45
	Total	53,09	16,92	81
Ukupno	R ≤ 1 ; negativan (0)	46,00	16,59	13
	R ≥ 2 ≤ 3 ; slabo pozitivan (1+)	53,16	15,52	18
	R ≥ 4 ≤ 6 ; umjeren pozitivan (2+)	50,65	16,21	64
	R = 9 ; jako pozitivan (3+)	47,50	18,07	83
	Total	49,10	17,06	178

Kruskal-Wallis H test:  $\chi^2=2,40$ ,  $p=0,48$

Ordinalna logistička regresija je utvrdila prediktivni uticaj prisustva holesteatoma u odnosu na starosne grupe, gdje je uočena statistički značajno veća vjerovatnoća ( $p<0,01$ ) prisustva holesteatoma kod ispitanika mlađe starosne dobi. Prediktorski model nije dokazao statistički značajnu povezanost stepena ekspresije IL-1 s pojedinim starosnim grupama (Tabela 6).

**Tabela 6.** Ekspresija IL-1 prema starosnim grupama ispitanika

Prediktori	Beta	S.E.	Wald	df	p	95% C.I.	
						Donja granica	Gornja granica
Eksperimentalna grupa	-1,005	,300	11,258	1	,001**	-1,592	-,418
Kontrolna grupa	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.
IL1: negativan (0)	,376	,568	,438	1	,508	-,737	1,489
IL1: slabo pozitivan (1+)	,526	,489	1,157	1	,282	-,433	1,485
IL1: umjерено pozitivan (2+)	,425	,313	1,845	1	,174	-,188	1,038
IL1: jako pozitivan (3+) (konstanta)	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.

\*\* $p<0,01$ , Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; a. Varijable uključene u step I: grupa: E/K, IL-1; S.E. - Standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode, C.I. – interval povjerenja

### 5.1.1.3. Ekspresija MMP-9 i starosna dob ispitanika

Primjenom Kruskal-Wallis  $H$  testa je utvrđena statistički značajna razlika između ispitanika obje grupe u odnosu na stepen ekspresije MMP-9, gdje su ispitanici eksperimentalne grupe imali statistički značajno ( $\chi^2=8,86$ ,  $p=0,003$ ;  $p<0,01$ ) nižu starosnu dob u odnosu na ispitanike kontrolne. Razlika starosne dobi između ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe u odnosu na stepen ekspresije MMP-9 se nije pokazala statistički značajnom ( $\chi^2=2,309$ ,  $p=0,564$ ;  $p>0,05$ ) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Ekspresija MMP-9 prema starosnoj dobi ispitanika

Grupa	Rezultati ekspresije MMP-9	M	SD	N
Eksperimentalna	R ≤ 1 ; negativan (0)	48,91	16,78	32
	R ≥ 2 ≤ 3 ; slabo pozitivan (1+)	43,33	18,67	27
	R ≥ 4 ≤ 6 ; umjereno pozitivan (2+)	44,33	19,81	36
	R = 9 ; jako pozitivan (3+)	17,50	3,54	2
	Ukupno	45,01	18,72	97
Kontrolna	R ≤ 1 ; negativan (0)	52,82	15,05	39
	R ≥ 2 ≤ 3 ; slabo pozitivan (1+)	55,04	11,35	26
	R ≥ 4 ≤ 6 ; umjereno pozitivan (2+)	54,71	13,49	14
	R = 9 ; jako pozitivan (3+)	58,50	2,12	2
	Ukupno	54,00	13,38	81
Ukupno	R ≤ 1 ; negativan (0)	51,06	15,86	71
	R ≥ 2 ≤ 3 ; slabo pozitivan (1+)	49,08	16,47	53
	R ≥ 4 ≤ 6 ; umjereno pozitivan (2+)	47,24	18,73	50
	R = 9 ; jako pozitivan (3+)	38,00	23,79	4
	Ukupno	49,10	17,06	178

**Kruskal-Wallis  $H$  test:**  $\chi^2=2,309$ ,  $p=0,564$ , M - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija

Ordinalna logistička regresija je utvrdila statistički značajnu povezanost prisustva holesteatoma u odnosu na starosne grupe, gdje je uočena statistički značajno veća vjerovatnoća ( $p<0,01$ ) prisustva holesteatoma kod ispitanika mlađe starosne dobi. Prediktorski model nije dokazao statistički značajnu povezanost stepena ekspresije MMP-9 s pojedinim starosnim grupama (Tabela 8).

**Tabela 8. Ekspresija MMP-9 prema starosnim grupama ispitanika**

Prediktori	Beta	S.E.	Wald	df	p	95% C.I.	
						Donja granica	Gornja granica
Eksperimentalna grupa	-,969	,298	10,560	1	,001**	-1,553	-,385
Kontrolna grupa	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.
MMP-9: negativan (0)	1,526	,933	2,673	1	,102	-,303	3,355
MMP-9: slabo pozitivan (1+)	1,351	,940	2,064	1	,151	-,492	3,194
MMP-9: umjereno pozitivan (2+)	1,514	,946	2,561	1	,110	-,340	3,368
MMP-9: jako pozitivan (3+)	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.

\*\* $p<0,01$ , Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; a. Varijable uključene u step I: grupa: E/K, MMP-9; S.E. - standardna greška regresije, df - broj stepeni slobode, C.I. – interval povjerenja

### 5.1.2. Polna struktura ispitanika

Od ukupnog broja ispitanika, 95 (53,4%) je pripadalo muškom, a 83 (46,6%) ženskom polu. Rezultati  $\chi^2$  testa su pokazali statistički značajnu razliku između obje grupe prema polnoj strukturi ( $p<0,01$ ), gdje su u eksperimentalnoj grupi ispitanici muškog pola bili značajnije zastupljeni (Tabela 9).

**Tabela 9. Polna struktura ispitanika**

Pol	Muški	N	Grupa		Ukupno
			Eksperimentalna	Kontrolna	
Pol	Muški	N	61	34	95
		%	62,9%	42,0%	53,4%
	Ženski	N	36	47	83
		%	37,1%	58,0%	46,6%
Ukupno		N	97	81	178
		%	100,0%	100,0%	100,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=7,75$ ,  $p=0,005$ ;  $p<0,01$

#### 5.1.2.1. Ekspresija TNF-R2 i polna struktura ispitanika

Multinominalna logistička regresija je utvrdila prediktivni uticaj prisustva holesteatoma prema polnoj strukturi ispitanika, gdje postoji statistički značajno veća vjerovatnoća ( $p<0,05$ ) prisustva holesteatoma kod ispitanika muškog pola. Vjerovatnoća da će ispitanici

pripadati muškom polu je bila statistički značajno manja kod negativne ekspresije TNF-R2 ( $p<0,05$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Ekspresija TNF-R2 prema polnoj strukturi ispitanika

	Pol <sup>a</sup>	B	Exp(B)	p
Muški	Intercept	,205		,656
	Eksperimentalna grupa	,787	2,196	,016*
	Kontrolna grupa	0 <sup>b</sup>	.	.
	TNF-R2: negativan (0)	-1,262	,283	,041*
	TNF-R2: slabo pozitivan (1+)	-,583	,558	,248
	TNF-R2: umjereno pozitivan (2+)	-,452	,636	,321
	TNF-R2: jako pozitivan (3+)	0 <sup>b</sup>	.	.

\* $p<0,05$ , a. Referentna kategorija: ženski; Intercept - konstanta, TNF-R2 – receptor tumora nekroze alfa, b. Parametar iznosi 0 jer je redundantan; B - koeficijent za konstantu, Exp (B) - eksponencija B koeficijenta

### 5.1.2.2. Ekspresija IL-1 i polna struktura ispitanika

Multinominalna logistička regresija je utvrdila prediktivni uticaj prisustva holesteatoma u odnosu na polnu strukturu ispitanika, gdje postoji statistički značajno veća vjerovatnoća ( $p<0,01$ ) prisustva holesteatoma kod ispitanika muškog pola. Prediktorski model koji je uključio rezultate ekspresije IL-1 nije dokazao statistički značajan uticaj na polnu pripadnost kod ispitanika obje grupe (Tabela 11).

**Tabela 11.** Ekspresija IL-1 prema polnoj strukturi ispitanika

	Pol <sup>a</sup>	B	Exp(B)	p
Muški	Intercept	-,364		,173
	Eksperimentalna grupa	,966	2,628	,003**
	Kontrolna grupa	0 <sup>b</sup>	.	.
	IL1: negativan (0)	-1,008	,365	,114
	IL1: slabo pozitivan (1+)	,247	1,280	,651
	IL1: umjereno pozitivan (2+)	,084	1,088	,807
	IL1: jako pozitivan (3+)	0 <sup>b</sup>	.	.

\*\* $p<0,01$ , a. Referentna kategorija: ženski; Intercept – konstanta, b. Parametar iznosi 0 jer je redundantan; B - koeficijent za konstantu, Exp (B) – eksponencija B koeficijenta

### 5.1.2.3. Ekspresija MMP-9 i polna struktura ispitanika

Multinominalna logistička regresija je utvrdila da postoji statistički relativno povećanje vjerovatnoće ( $p<0,05$ ) za prisustvo holesteatoma kod ispitanika muškog pola. Prediktorski model koji je uključio rezultate ekspresije MMP-9 nije dokazao statistički značajan uticaj na polnu pripadnost kod ispitanika obje grupe (Tabela 12).

**Tabela 12.** Ekspresija MMP-9 prema polnoj strukturi ispitanika

	Pol <sup>a</sup>	B	Exp(B)	p
Muški	Intercept	-,365		,723
	Eksperimentalna grupa	,730	2,076	,021*
	Kontrolna grupa	0 <sup>b</sup>		
	MMP-9: negativan (0)	-,109	,897	,917
	MMP-9: slabo pozitivan (1+)	-,046	,955	,965
	MMP-9: umjereni pozitivan (2+)	,611	1,841	,566
	MMP-9: jako pozitivan (3+)	0 <sup>b</sup>	.	.

\* $p<0,05$ , a. Referentna kategorija: ženski; Intercept – konstanta, b. Parametar iznosi 0 jer je redundantan; B - koeficijent za konstantu, Exp (B) – eksponencija B koeficijenta

## 5.2. Medijatori inflamacije i simptomi hronične upale srednjeg uha

### 5.2.1. Otalgija

U ukupnom uzorku kod 158 (88,8%) ispitanika je bio prisutan simptom otalgije, a kod 20 (11,2%) odsutan. Razlika dobijena analizom distribucije ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe u odnosu na prisustvo simptoma otalgije nije bila od statističkog značaja (Tabela 13). Binarna logistička regresija nije pokazala statistički značajan uticaj prisustva holesteatoma niti rezultata ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 u predikciji uticaja na pojavu simptoma otalgije.

**Tabela 13.** Ispitanici prema prisustvu simptoma otalgije

	Simptom	Grupa		Ukupno	
		Eksperimentalna	Kontrolna		
Otalgija	Da	N	85	73	
		%	47,8%	41,0% 88,8%	
	Ne	N	12	8	
		%	12,4%	9,9% 11,2%	
Ukupno		N	97	81	
		%	100,0%	100,0% 100,0%	

Chi-square test:  $\chi^2=0,27$ ,  $p=0,60$

### 5.2.2. Sekrecija iz uha

U ukupnom uzorku je registrovano 169 (94,9%) ispitanika sa simptomom sekrecije iz uha, a samo 9 (5,1%) bez prisustva navedenog simptoma. Razlika dobijena analizom distribucije ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe u odnosu na simptom sekrecije iz uha nije bila od statističkog značaja (Tabela 14). Binarna logistička regresija nije pokazala značajan uticaj prisustva holesteatoma niti rezultata ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 u predikciji uticaja na pojavu simptoma sekrecije iz uha.

**Tabela 14.** Ispitanici prema prisustvu simptoma sekrecije iz uha

	Simptom	Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Sekrecija iz uha	Da	N	92	77
		%	94,8%	95,1%
	Ne	N	5	4
		%	5,2%	4,9%
Ukupno		N	97	81
		%	100,0%	100,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=0,40$ ,  $p=0,95$

### 5.2.3. Oslabljen sluh

U ukupnom uzorku kod 169 (94,9%) ispitanika je zabilježeno prisustvo simptoma oslabljenog sluha, a samo kod 9 (5,1%) odsustvo navedenog simptoma. Razlika dobijena analizom distribucije ispitanika obje grupe u odnosu na prisustvo simptoma oslabljenog sluha nije bila od statističkog značaja (Tabela 15). Binarna logistička regresija nije pokazala značajan uticaj prisustva holesteatoma niti rezultata ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 u predikciji uticaja na pojavu simptoma oslabljenog sluha.

**Tabela 15.** Ispitanici prema prisustvu simptoma oslabljenog sluha

	Simptom	Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Oslabljen sluh	Da	N	92	77
		%	94,8%	95,1%
	Ne	N	5	4
		%	5,2%	4,9%
Ukupno		N	97	81
		%	100,0%	100,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=0,40$ ,  $p=0,95$

#### 5.2.4. Tinitus

Kada je ispitivan simptom tinitusa, kod 99 (55,6%) ispitanika je zabilježeno njegovo prisustvo, a kod 79 (44,4%) odsustvo. Razlika dobijena analizom distribucije ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe u odnosu na prisustvo simptoma tinitusa nije bila od statističkog značaja (Tabela 16). Binarna logistička regresija nije pokazala značajan uticaj prisustva holesteatoma niti rezultata ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 u predikciji uticaja na pojavu simptoma tinitusa.

**Tabela 16.** Ispitanici prema prisustvbu simptoma tinitusa

	Simptom	Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Tinitus	Da	N	57	42
		%	58,8%	51,9% 55,6%
	Ne	N	40	39
		%	41,2%	48,1% 44,4%
Ukupno		N	97	81
		%	100,0%	100,0% 100,0%

**Chi-square test:**  $\chi^2 = 0,85$ ,  $p = 0,35$

#### 5.2.5. Vrtoglavica

Od ukupnog broja ispitanika, 41 (23%) ispitanik je imao simptom vrtoglavice, dok je kod 137 (77%) navedeni simptom bio odsutan. Razlika dobijena analizom distribucije ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe prema simptomu vrtoglavice je bila od statističkog značaja ( $p < 0,01$ ), kao što distribucija i pokazuje (Tabela 17).

**Tabela 17.** Ispitanici prema prisustvu simptoma vrtoglavice

	Simptom	Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Vrtoglavica	Da	N	30	11
		%	30,9%	13,6% 23,0%
	Ne	N	67	70
		%	69,1%	86,4% 77,0%
Ukupno		N	97	81
		%	100,0%	100,0% 100,0%

**Chi-square test:**  $\chi^2 = 7,49$ ,  $p = 0,006$ ;  $p < 0,01$

### 5.2.5.1. Ekspresija TNF-R2 i simptom vrtoglavice

Binarna logistička regresija je pokazala da prisustvo holesteatoma ima statistički prediktivni uticaj ( $p<0,05$ ) na pojavu simptoma vrtoglavice pri čemu je vjerovatnoća pojave navedenog simptoma kod ispitanika eksperimentalne grupe bila za 2,6 puta veća u odnosu na ispitanike kontrolne grupe. Kategorije ekspresije TNF-R2 nisu imale prediktivni uticaj na pojavu simptoma vrtoglavice (Tabela 18).

**Tabela 18.** Ekspresija TNF-R2 prema prisustvu simptoma vrtoglavice

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Grupa: E/K(1)	,959	,412	5,428	1	,020*	2,610	1,165	5,848
TNFR2			2,571	3	,463			
TNFR2: negativan (0)	-,320	,647	,245	1	,621	,726	,204	2,580
TNFR2: slabo pozitivan (1+)	-,328	,539	,370	1	,543	,720	,250	2,073
TNFR2: umjeren pozitivan (2+)	-,749	,480	2,432	1	,119	,473	,185	1,212
Konstanta	-1,367	,512	7,125	1	,008	,255		

\*  $p<0,05$ ; TNF-R2 – receptor tumora nekroze alfa, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, TNF-R2, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - Broj stepeni slobode, Exp (B) – eksponencija B koeficijenta, C.I. – interval povjerenja

### 5.2.5.2. Ekspresija IL-1 i simptom vrtoglavice

Binarna logistička regresija je pokazala da holesteatomima ima statistički prediktivni uticaj ( $p<0,01$ ) na pojavu simptoma vrtoglavice, a vjerovatnoća da će ispitanici eksperimentalne grupe imati vrtoglavicu je bila 3,2 puta veća u odnosu na ispitanike kontrolne (Tabela 19).

**Tabela 19.** Ekspresija IL-1 prema prisustvu simptoma vrtoglavice

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Grupa: E/K(1)	1,165	,399	8,535	1	,003**	3,205	1,467	7,002
IL1			2,949	3	,399			
IL1: negativan (0)	-,1,680	1,087	2,389	1	,122	,186	,022	1,569
IL1: slabo pozitivan (1+)	,171	,608	,079	1	,778	1,186	,360	3,906
IL1: umjeren pozitivan (2+)	,161	,401	,160	1	,689	1,174	,535	2,577
Konstanta	-1,913	,369	26,816	1	,000	,148		

\*\*  $p<0,01$ ; IL-1 - interleukin – 1, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, IL-1, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - broj stepeni slobode, Exp (B) – eksponencija B koeficijenta, C.I. – interval povjerenja

### 5.2.5.3. Ekspresija MMP-9 i simptom vrtoglavice

Binarna logistička regresija je pokazala da prisustvo holesteatoma ima statistički prediktivni uticaj ( $p<0,05$ ) na pojavu simptoma vrtoglavice, a vjerovatnoća da će ispitanici eksperimentalne grupe imati vrtoglavicu je bila 2,6 puta veća u odnosu na ispitanike kontrolne grupe. Mala distribucija ispitanika u kontrolnoj grupi nije dozvolila izračunavanje koeficijenata prediktora MMP-9 prema pojedinačnim kategorijama ekspresije (Tabela 20).

**Tabela 20.** Ekspresija MMP-9 prema prisustvu simptoma vrtoglavice

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Grupa: E/K(1)	,958	,401	5,700	1	,017	2,607	1,187	5,724
MMP-9			1,365	3	,714			

\* $p<0,05$ ; MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, MMP-9, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greska, df- broj stepeni slobode, Exp (B) – eksponencija B koeficijenta, C.I. – interval povjerenja

### 5.2.6. Glavobolja

Kod 131 (73,6%) ispitanika zabilježeno je prisustvo simptoma glavobolje, a kod 47 (26,4%) odsustvo navedenog simptoma. Razlika dobijena analizom distribucije ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe u odnosu na prisustvo simptoma glavobolje je bila od statističkog značaja ( $p<0,05$ ), kao što distribucija pokazuje (Tabela 21).

**Tabela 21.** Ispitanici prema prisustvu simptoma glavobolje

	Simptom	Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Glavobolja	Da	N	33	47
		%	34,0%	17,3% 26,4%
	Ne	N	64	67 131
		%	66,0%	82,7% 73,6%
Ukupno		N	97	81 178
		%	100,0%	100,0% 100,0%

**Chi-square test:**  $\chi^2=6,36$ ,  $p=0,012$ ;  $p<0,05$

### 5.2.6.1. Ekspresija TNF-R2 i simptom glavobolje

Binarna logistička regresija je pokazala da prisustvo holesteatoma ima statistički prediktivni uticaj ( $p<0,05$ ) na pojavu simptoma glavobolje, a vjerovatnoća da će ispitanici eksperimentalne grupe imati glavobolju je bila za 2,36 puta veća u odnosu na ispitanike kontrolne grupe (Tabela 22).

**Tabela 22.** Ekspresija TNF-R2 prema prisustvu simptoma glavobolje

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Grupa: E/K(1)	,859	,381	5,090	1	,024*	2,362	1,119	4,982
TNF-R2			1,374	3	,712			
TNF-R2:negativan (0)	,310	,615	,254	1	,614	1,364	,409	4,552
TNF-R2: slabo pozitivan (1+)	-,102	,534	,037	1	,848	,903	,317	2,573
TNF-R2: umjerenog pozitivan (2+)	-,311	,470	,437	1	,509	,733	,292	1,842
Konstanta	-1,417	,499	8,079	1	,004	,242		

\* $p<0,05$ ; TNF-R2 – receptor tumora nekroze alfa, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, TNF-R2, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - broj stepeni slobode, Exp (B) – eksponencija B koeficijenta, C.I. – interval povjerenja

### 5.2.6.2. Ekspresija IL-1 i simptom glavobolje

Uvidom u učešće pojedinačnih varijabli u prediktorskom modelu uočeno je da je prisustvo holesteatoma imalo statistički prediktivni uticaj ( $p<0,05$ ) na pojavu simptoma glavobolje, a vjerovatnoća da će ispitanici eksperimentalne grupe imati navedeni simptom je bila za 2,5 puta veća u odnosu na ispitanike kontrolne grupe (Tabela 23).

**Tabela 23.** Ekspresija IL-1 prema prisustvu simptoma glavobolje

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Grupa: E/K(1)	,917	,373	6,050	1	,014*	2,502	1,205	5,195
IL1			,031	3	,999			
IL1: negativan (0)	-,116	,671	,030	1	,862	,890	,239	3,319
IL1: slabo pozitivan (1+)	-,008	,597	,000	1	,990	,992	,308	3,195
IL1: umjerenog pozitivan (2+)	-,028	,388	,005	1	,942	,972	,454	2,081
Konstanta	-1,554	,334	21,658	1	,000	,211		

\*\* $p<0,05$ ; IL-1 - interleukin – 1, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, IL-1, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - broj stepeni slobode, Exp (B) - eksponencija B koeficijenta, C.I. - interval povjerenja

### 5.2.6.3. Ekspresija MMP-9 i simptom glavobolje

Najjači prediktor pojave simptoma glavobolje je bilo prisustvo holesteatoma ( $p<0,05$ ), a vjerovatnoća da će ispitanici eksperimentalne grupe imati simptom glavobolje je bila za 2,4 puta veća u odnosu na ispitanike kontrolne grupe (Tabela 24).

**Tabela 24.** Ekspresija MMP-9 prema prisustvu simptoma glavobolje

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Grupa: E/K(1)	,868	,375	5,357	1	,021*	2,381	1,142	4,966
MMP-9			1,371	2	,504			
MMP-9: negativan (0)	-,126	,417	,091	1	,763	,882	,389	1,998
MMP-9: slabo pozitivan (1+)	-,521	,462	1,277	1	,259	,594	,240	1,467
Konstanta	-1,315	,423	9,691	1	,002	,268		

\* $p<0,05$ ; MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, MMP-9, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - broj stepeni slobode, Exp (B) - eksponencija B koeficijenta, C.I. - interval povjerenja

### 5.3. Medijatori inflamacije prema vremenskom intervalu: pojava prvih simptoma bolesti - postavljanje dijagnoze

Vremenski interval od datuma pojave prvih simptoma bolesti do datuma postavljanja dijagnoze kretao se između 15 dana i 50 godina s prosječnom vrijednošću aproksimativno od 12 godina ( $SD\pm12,15$ ). Nije utvrđena statistički značajna razlika u aritmetičkim sredinama navedenog vremenskog intervala između ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe, kao i u aritmetičkim sredinama između ispitanika obje grupe u odnosu na stepen ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 (Tabela 25).

**Tabela 25.** Ispitanici prema vremenskom intervalu: prvi simptomi - postavljanje dijagnoze

	Cjelokupan uzorak	Eksperimentalna grupa	Kontrolna grupa
Pojava prvih simptoma - postavljanje dijagnoze u godinama	N	178	97
	M	12,39	11,97
	SD	12,15	11,86
	Minimum	0,05	12,55
	Maksimum	50	

**Mann-Whitney U test:**  $U=3847,000$ ,  $Z=-0,239$ ,  $p=0,811$ , M - aritmetička sredina, SD - standardna greška

## 5.4. Medijatori inflamacije prema vremenskom intervalu: dijagnoza bolesti - hirurško liječenje

Vremenski interval od datuma postavljanja dijagnoze do datuma prijema u kliniku zbog hirurškog liječenja kretao se između 10 dana i 30 godina, s prosječnom vrijednošću aproksimativno od devet mjeseci ( $SD \pm 30,12$ ). Nije utvrđena statistički značajna razlika u aritmetičkim sredinama navedenog vremenskog intervala između ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe (Tabela 26). Nije utvrđena statistički značajna razlika u aritmetičkim sredinama navedenog vremenskog intervala između ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe u odnosu na rezultate ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9.

**Tabela 26.** Ispitanici prema vremenskom intervalu: dijagnoza bolesti - hirurško liječenje

	Cjelokupan uzorak	Eksperimentalna grupa	Kontrolna grupa
	N	178	97
Postavljanje dijagnoze bolesti - hirurško liječenje	M	8,69	6,3
	SD	30,12	10,45
	Minimum	0,27	
	Maksimum	360	

*Mann-Whitney U test:*  $U=3680,5$ ,  $Z=-0,733$ ,  $p=0,464$ , M-aritmetička sredina, SD-stand. devijacija

## 5.5. Medijatori inflamacije i istorija bolesti hronične upale srednjeg uha

U ukupnom uzorku, porodična anamneza hronične upale srednjeg uha je bila pozitivna kod 61 (34,3%), a negativna kod 117 (65,7%) ispitanika. Razlika dobijena analizom distribucije ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe u odnosu na porodičnu anamnezu hronične upale srednjeg uha nije bila od statističkog značaja (Tabela 27).

**Tabela 27.** Ispitanici prema istoriji bolesti hronične upale srednjeg uha

	Da	Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Porodična anamneza (hronične upale srednjeg uha)	N	31	30	61
	%	32,0%	37,0%	34,3%
	N	66	51	117
	%	68,0%	63,0%	65,7%
Ukupno	N	97	81	178
	%	100,0%	100,0%	100,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=0,55$ ,  $p=0,47$

Prediktivni model nije pokazao statistički značajan uticaj holesteatoma niti rezultata ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 na porodičnu anamnezu hronične upale srednjeg uha.

## 5.6. Medijatori inflamacije i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha

U ukupnom uzorku 46 (25,8%) ispitanika je operativno tretirano zbog hronične upale srednjeg uha, unilateralno ili bilateralno, a 132 (74,2%) nije. Rezultati  $\chi^2$  testa su pokazali da postoji statistički značajna razlika ( $p<0,01$ ) između ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe gdje su u kontrolnoj dominantno bili zastupljeni ispitanici koji nisu operativno tretirani (Tabela 28).

**Tabela 28.** Ispitanici i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha

		Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha	Da	N	33	13
		%	34,0%	16,0%
	Ne	N	64	68
		%	66,0%	84,0%
Ukupno		N	97	81
		%	100,0%	100,0%
				178

*Chi-square test:*  $\chi^2=1,27$ ,  $p=0,259$

### 5.6.1. Ekspresija TNF-R2 i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha

Binarna logistička regresija nije pokazala statistički značajan uticaj ni jednog prediktora u modelu na istoriju prethodnih operativnih zahvata hronične upale srednjeg uha (Tabela 29).

**Tabela 29.** Ekspresija TNF-R2 i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Grupa: E/K(1)	1,011	,387	6,811	1	,009**	2,747	1,286	5,869
TNFR2			,647	3	,886			
TNFR2: negativan (0)	-,336	,690	,237	1	,627	,715	,185	2,763
TNFR2: slabo pozitivan (1+)	-,029	,550	,003	1	,958	,972	,331	2,855
TNFR2: umjereno pozitivan (2+)	,147	,472	,097	1	,755	1,159	,460	2,920
Konstanta	-1,69	,514	10,84	1	,001	,184		

\*\* $p<0,01$ , TNF-R2 – receptor tumora nekroze alfa, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, TNF-R2, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - broj stepeni slobode, Exp (B) - eksponencija B koeficijenta, C.I. – interval povjerenja

### 5.6.2. Ekspresija IL-1 i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha

Binarna logistička regresija je pokazala statistički značajnu povezanost ( $p<0,01$ ) prisustva holesteatoma i pozitivne istorije prethodnih operativnih zahvata hronične upale srednjeg uha, a vjerovatnoća da su ispitanici eksperimentalne grupe imali prethodne operativne zahvate je za 2,8 puta veća u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 30).

**Tabela 30.** Ekspresija IL-1 i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Grupa: E/K(1)	1,049	,380	7,621	1	,006**	2,854	1,355	6,008
IL1			1,024	3	,795			
IL1: negativan (0)	-,562	,724	,603	1	,437	,570	,138	2,355
IL1 : slabo pozitivan (1+)	,249	,576	,186	1	,666	1,283	,414	3,970
IL1: umjeren pozitivan (2+)	-,127	,395	,103	1	,748	,881	,406	1,910
Konstanta	-1,63	,342	22,765	1	,000	,196		

\*\* $p<0,01$ , IL-1 - interleukin – 1, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, IL1, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - broj stepeni slobode, Exp (B) - eksponencija B koeficijenta, C.I. - interval povjerenja

### 5.6.3. Ekspresija MMP-9 i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha

Binarna logistička regresija je pokazala statistički značajnu povezanost prisustva holesteatoma i pozitivne istorije prethodnih operativnih zahvata hronične upale srednjeg uha ( $p<0,01$ ), a vjerovatnoća da su ispitanici eksperimentalne grupe imali prethodne operativne zahvate je bila za 2,6 puta veća u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 31).

**Tabela 31.** Ekspresija MMP-9 i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Grupa:E/K(1)	,970	,377	6,623	1	,010**	2,637	1,260	5,519
MMP-9	,067	,202	,111	1	,739	1,070	,720	1,588
Konstanta	-1,773	,468	14,323	1	,000	,170		

\*\* $p<0,01$ , MMP-9 – matriks metalopteinaza , a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, MMP-9, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - broj stepeni slobode, Exp (B) - eksponencija B koeficijenta, C.I. - interval povjerenja

## 5.7. Medijatori inflamacije i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha; unilateralno i bilateralno

Od ukupno 46 (25,8%) operativno tretiranih ispitanika, 38 (82,6%) je podvrgnuto operativnom zahvatu na jednom, a osam (17,4%) na oba uha. Rezultati  $\chi^2$  testa nisu pokazali statistički značajnu razliku između eksperimentalne i kontrolne grupe po pitanju prethodnih operativnih zahvata, unilateralno ili bilateralno (Tabela 32).

**Tabela 32.** Ispitanici prema prethodnim operativnim zahvatima hronične upale srednjeg uha; unilateralno ili bilateralno

		Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Prethodni operativni zahvati (na jednom ili oba uha)	Unilateralno	N	26	12
		%	78,8%	92,3% 82,6%
	Bilateralno	N	7	1
		%	21,2%	7,7% 17,4%
Ukupno		N	33	13
		%	100,0%	100,0% 100,0%

**Chi-square test:**  $\chi^2=1,27$ ,  $p=0,26$

### 5.7.1. Ekspresija TNF-R2 i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha; unilateralno i bilateralno

Iako ukupan model nije pokazao statističku značajnost, uvidom u učešće pojedinačnih rezultata ekspresije TNF-R2 dobijen je rezultat relativno niske statističke značajnosti ( $p=0,068$ ) na osnovu čega se može zaključiti da će se s povećanjem stepena ekspresije TNF-R2 povećavati i vjerovatnoća da su ispitanici operativno tretirani unilateralno ili bilateralno (Tabela 33).

**Tabela 33.** Ekspresija TNF-R2 i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha; unilateralno ili bilateralno

	Standardni koeficijenti		df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	-,126	,137	1	,844	,364
TNF-R2	,200	,125	3	2,561	,068

*TNF-R2 – receptor tumor nekroze alfa, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode, F - test omjera varijanse*

### **5.7.2. Ekspresija IL-1 i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha; unilateralno i bilateralno**

Iako ukupan model nije pokazao statističku značajnost, utvrđeno je da je klasifikacija prema rezultatima ekspresije IL-1 imala statistički značajan uticaj ( $p<0,05$ ) na vjerovatnoću da su ispitanici imali prethodne operativne zahvate na jednom ili oba uha. Ovaj rezultat implicira da se s povećanjem stepena ekspresije IL-1 povećava i vjerovatnoća da su ispitanici imali prethodne operativne zahvate, unilateralno ili bilateralno (Tabela 34).

**Tabela 34.** *Ekspresija IL-1 i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha, unilateralno ili bilateralno*

	Standardni koeficijenti		Df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	-,156	,112	1	1,953	,170
IL-1	,250	,125	3	3,963	,015*

\* $p<0,05$ , IL-1 - interleukin – 1, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; F - test omjera varijanse

### **5.7.3. Ekspresija MMP-9 i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha; unilateralno i bilateralno**

Iako ukupan model nije pokazao statističku značajnost, utvrđeno je da je klasifikacija prema rezultatima ekspresije MMP-9 imala statistički značajan uticaj ( $p<0,01$ ) na ispitivanu pojavu. Ovaj rezultat implicira da se s povećanjem vrijednosti na MMP-9 skali povećava i vjerovatnoća da su ispitanici imali prethodne operativne zahvate, unilateralno ili bilateralno (Tabela 35).

**Tabela 35.** *Ekspresija MMP-9 i prethodni operativni zahvati hronične upale srednjeg uha; unilateralno ili bilateralno*

	Standardni koeficijenti		Df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	-,057	,127	1	,198	,659
MMP-9	,278	,106	3	6,907	,001**

\*\* $p<0,01$ , MMP-9 – matriks metaloproteinaza, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; F - test omjera varijanse

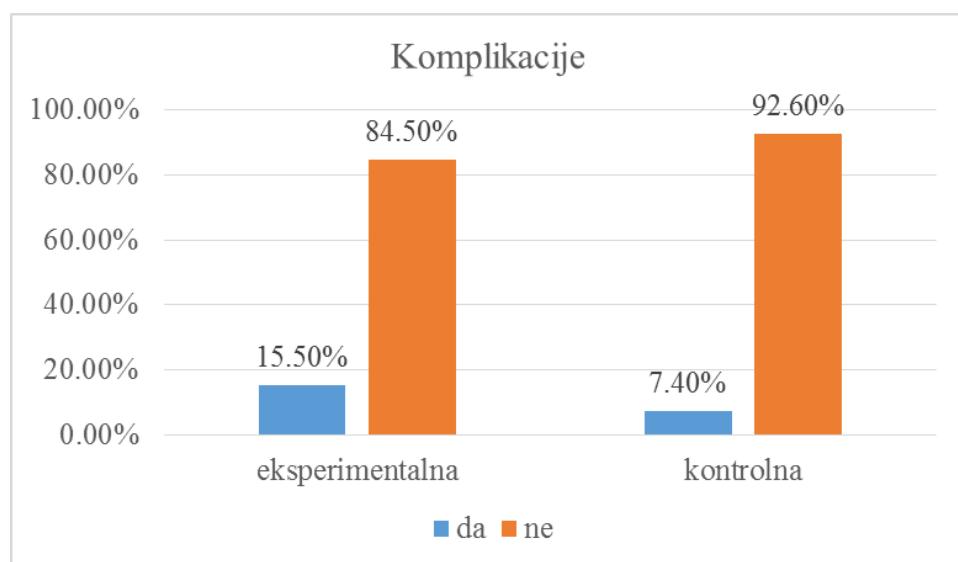
## 5.8. Medijatori inflamacije i otogene komplikacije hronične upale srednjeg uha

Otogene komplikacije su bile prisutne samo kod 21 (11,8%) ispitanika, dok kod 157 (88,2%) njihovo prisustvo nije utvrđeno. U izolovanom ili udruženom obliku, otogene komplikacije su bile prisutne kod 15 (15,5%) ispitanika eksperimentalne i 6 (7,4%) ispitanika kontrolne grupe (Slika 15). Razlika dobijena  $\chi^2$  testom između ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe u odnosu na ispitivanu pojavu nije bila od statističkog značaja (Tabela 36). Binarna logistička regresija nije pokazala statistički značajan doprinos prisustva holesteatoma i rezultata ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 za predikciju nastanka otogenih komplikacija.

**Tabela 36.** Ispitanici prema otogenim komplikacijama hronične upale srednjeg uha

		Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Komplikacije	Da	N	15	6
		%	15,5%	7,4%
Komplikacije	Ne	N	82	75
		%	84,5%	92,6%
Ukupno		N	97	81
		%	100,0%	100,0%
178				

*Chi-square test:*  $\chi^2=2,75$ ,  $p=0,09$



**Slika 15.** Ispitanici prema otogenim komplikacijama hronične upale srednjeg uha

## 5.9. Medijatori inflamacije i antibiotska terapija

### 5.9.1. Upotreba antibiotske terapije

U ukupnom uzorku, samo šest (3,4%) ispitanika nije koristilo antibiotsku terapiju, dok svi ostali jesu. Nije uočena statistički značajna razlika između eksperimentalne i kontrole grupe po pitanju upotrebe antibiotske terapije (Tabela 37). Binarna logistička regresija nije pokazala statistički značajan doprinos prisustva holesteatoma i rezultata ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 za predikciju upotrebe antibiotske terapije.

**Tabela 37. Ispitanici prema upotrebi antibiotske terapije**

		Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Upotreba antibiotske terapije	Da	N	94	77
		%	97,9%	95,1%
	Ne	N	2	4
		%	2,1%	4,9%
Ukupno		N	96	81
		%	100,0%	100,0%
<i>Chi-square test: <math>\chi^2=1,09</math>, <math>p=0,29</math></i>				

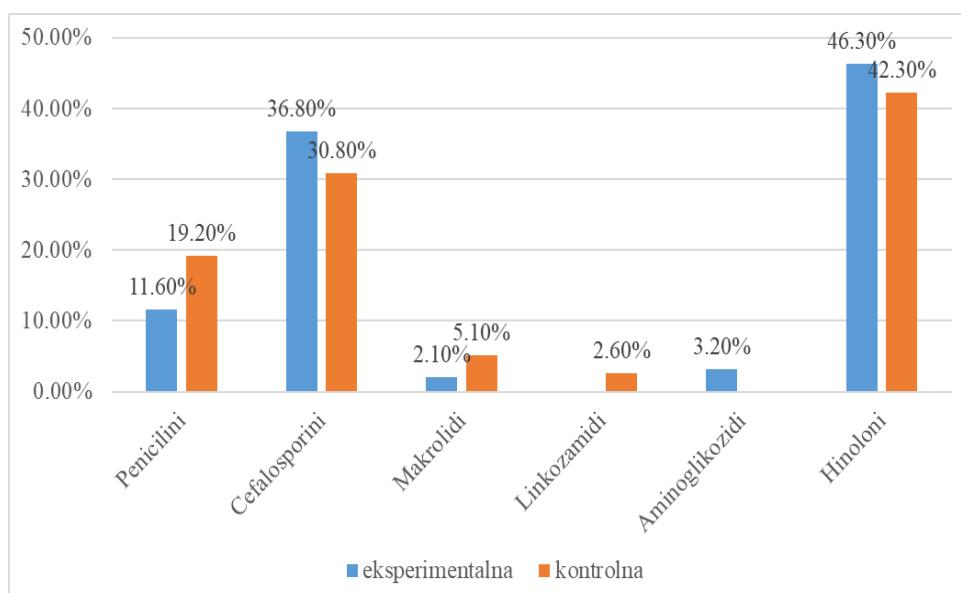
### 5.9.2. Vrsta antibiotske terapije

Razlika dobijena  $\chi^2$  testom, između ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe u odnosu na vrstu korištene antibiotske terapije nije bila statistički značajna (Tabela 38). Distribucija ispitanika u ukupnom uzorku prema vrsti antibiotske terapije, pokazuje da su u najvećem procentu korišteni antibiotici iz reda hinolona (44,5%) i cefalosporina (34,1%) (Slika 16).

**Tabela 38.** Ispitanici prema vrsti antibiotske terapije

Vrsta antibiotske terapije	Grupa		Ukupno
	Eksperimentalna	Kontrolna	
Penicilini	N %	11 11,6%	15 19,2%
Cefalosporini	N %	35 36,8%	24 30,8%
Makrolidi	N %	2 2,1%	4 5,1%
Linkozamidi	N %	0 0,0%	2 2,6%
Aminoglikozidi	N %	3 3,2%	0 0,0%
Hinoloni	N %	44 46,3%	33 42,3%
Ukupno	N %	95 100,0%	78 100,0%
			173 100,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=8,31$ ,  $p=0,14$



**Slika 16.** Ispitanici prema vrsti antibiotske terapije

### 5.9.2.1. Ekspresija TNF-R2 i vrsta antibiotske terapije

Iako ukupan model nema statistički značajan uticaj na predviđanje vjerovatnoće korištenja pojedine vrste antibiotske terapije, uvidom u učešće pojedinačnih varijabli u modelu, pokazalo se da je klasifikacija prema rezultatima ekspresije TNF-R2 imala statistički značajan uticaj na vrstu ordinirane antibiotske terapije. Ovaj rezultat implicira da se s povećanjem stepena ekspresije TNF-R2 povećava i vjerovatnoća upotrebe antibiotika iz reda hinolona (Tabela 39).

**Tabela 39.** Ekspresija TNF-R2 i vrsta antibiotske terapije

	Standardni koeficijenti		df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	-,048	,114	1	,178	,674
TNF-R2	,202	,073	3	7,588	,000**

\*\* $p<0,01$ , TNF-R2 – receptor tumora nekroze alfa, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; F - jednofaktorska analiza varijanse

### 5.9.2.2. Ekspresija IL-1 i vrsta antibiotske terapije

Iako ukupan model nema statistički značajan uticaj na predviđanje vjerovatnoće korištenja pojedine vrste antibiotske terapije, uvidom u učešće pojedinačnih varijabli u modelu, pokazalo se da je klasifikacija prema rezultatima ekspresije IL-1 imala statistički značajan uticaj na vrstu ordinirane antibiotske terapije. Ovaj rezultat implicira da se s povećanjem stepena ekspresije IL-1 povećava i vjerovatnoća upotrebe antibiotika iz reda hinolona (Tabela 40).

**Tabela 40.** Ekspresija IL-1 i vrsta antibiotske terapije

	Standardni koeficijenti		Df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	-,104	,108	1	,925	,338
IL-1	,138	,073	3	3,552	,016*

\* $p<0,05$ , IL-1 – interleukin, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; F - test omjera varijanse

### 5.9.2.3. Ekspresija MMP-9 i vrsta antibiotske terapije

Iako ukupan model nema statistički značajan uticaj na predviđanje vjerovatnoće korištenja pojedine vrste antibiotske terapije, uvidom u učešće pojedinačnih varijabli u modelu pokazalo se da je klasifikacija prema rezultatima ekspresije MMP-9 imala statistički značajan uticaj na vrstu ordinirane antibiotske terapije. Ovaj rezultat implicira da se s povećanjem stepena ekspresije MMP-9 povećava i vjerovatnoća upotrebe antibiotika iz reda hinolona (Tabela 41).

**Tabela 41.** Ekspresija MMP-9 i vrsta antibiotske terapije

	Standardni koeficijenti		df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	-,088	,102	1	,744	,390
MMP-9	,131	,062	3	,451	,005**

\*\* $p<0,01$ , MMP-9 – matriks metaloproteinaza, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; F - test omjera varijanse

### 5.9.3. Vremensko ordiniranje antibiotske terapije

Kod 108 (62,4%) ispitanika u ukupnom uzorku, ordiniranje antibiotske terapije je trajalo osam do četiri dana, a kod 53 (30,6%) sedam ili manje. Rezultati  $\chi^2$  testa su pokazali da postoji statistički značajna razlika ( $p<0,01$ ) između eksperimentalne i kontrolne grupe u odnosu na vremensko ordiniranje antibiotske terapije, gdje je 69 (72,6%) ispitanika eksperimentalne grupe najčešće koristilo antibiotsku terapiju u periodu od 8-14 dana. Kod 32 (41%) ispitanika kontrolne grupe ordiniranje antibiotske terapije trajalo je sedam ili manje, a kod 39 (50%) 8-14 dana (Tabela 42).

**Tabela 42.** Ispitanici prema vremenskom ordiniranju antibiotske terapije

		Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Vremensko ordiniranje antibotske terapije	"≤ 7 dana"	N	21	32
		%	22,1%	41,0%
	"8-14 dana"	N	69	39
		%	72,6%	50,0%
	"≥ 15 dana"	N	5	7
		%	5,3%	9,0%
Ukupno		N	95	78
		%	100,0%	100,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=9,37$ ,  $p=0,009$ ;  $p<0,01$

### 5.9.3.1. Ekspresija TNF-R2 i vremensko ordiniranje antibiotske terapije

Ordinalna logistička regresija je dokazala da prisustvo holesteatoma ima statistički prediktivni uticaj ( $p<0,05$ ) na vremensko ordiniranje antibiotske terapije za razliku od rezultata ekspresije TNF-R2. Veća je vjerovatnoća da će ispitanici u grupi s holesteatomom koristiti antibiotsku terapiju duži vremenski period (Tabela 43).

**Tabela 43.** Ekspresija TNF-R2 i vremensko ordiniranje antibiotske terapije

Prediktori	Beta	S.E.	Wald	Df	p	95% CI	
						Donja granica	Gornja granica
Eksperimentalna grupa	,690	,332	4,305	1	,038*	,038	1,341
Kontrolna grupa	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.
TNF-R2: negativan (0)	-,096	,586	,027	1	,870	-1,245	1,053
TNF-R2: slabo poz. (1+)	,100	,493	,041	1	,839	-,866	1,066
TNF-R2: umjерено pozitivan (2+)	,471	,441	1,143	1	,285	-,392	1,335
TNF-R2: jako pozitivan (3+)	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.

\* $p<0,05$ , TNF-R2 – receptor tumora nekroze alfa, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije, S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode, CI - interval povjerenja

### 5.9.3.2. Ekspresija IL-1 i vremensko ordiniranje antibiotske terapije

Ordinalna logistička regresija je dokazala da prisustvo holesteatoma ima statistički prediktivni uticaj ( $p<0,05$ ) na vremensko ordiniranje antibiotske terapije za razliku od rezultata ekspresije IL-1. Veća je vjerovatnoća da će ispitanici u grupi s holesteatomom koristiti antibiotsku terapiju duži vremenski period (Tabela 44).

**Tabela 44.** Ekspresija IL-1 i vremensko ordiniranje antibiotske terapije

Prediktori	Beta	S.E.	Wald	df	p	95% CI	
						Donja granica	Gornja granica
Eksperimentalna grupa	,662	,324	3,777	1	,050*	,014	1,257
Kontrolna grupa	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.
IL1: negativan (0)	,033	,640	,003	1	,959	-1,220	1,287
IL1: slabo pozitivan (1+)	,429	,562	,583	1	,445	-,672	1,529
IL1: umjерено pozitivan (2+)	-,136	,345	,154	1	,695	-,812	,541
IL1: jako pozitivan (3+)	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.

\* $p<0,05$ , IL-1 – interleukin, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; CI - interval povjerenja

### 5.9.3.3. Ekspresija MMP-9 i vremensko ordiniranje antibiotske terapije

Ordinalna logistička regresija je dokazala da prisustvo holesteatoma ima statistički prediktivni uticaj ( $p<0,05$ ) na vremensko ordiniranje antibiotske terapije, za razliku od rezultata ekspresije MMP-9. Veća je vjerovatnoća da će ispitanici u grupi s holesteatomom koristiti antibiotsku terapiju duži vremenski period (Tabela 45).

**Tabela 45.** Ekspresija MMP-9 i vremensko ordiniranje antibiotske terapije

Prediktori	Beta	S.E.	Wald	df	p	95% C.I.	
						Donja granica	Gornja granica
Eksperimentalna grupa	,679	,323	4,417	1	,036*	,046	1,313
Kontrolna grupa	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.
MMP-9: negativan (0)	,344	1,031	,112	1	,738	-1,676	2,365
MMP-9: slabo pozitivan (1+)	,497	1,041	,228	1	,633	-1,543	2,536
MMP-9: umjeren pozitivan (2+)	,192	1,043	,034	1	,854	-1,853	2,237
MMP-9=4: jako pozitivan (3+)	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.

\* $p<0,05$ , MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; CI - interval povjerenja

## 5.10. Medijatori inflamacije i patomorfološke promjene srednjeg uha

### 5.10.1. Perforacija membrane timpani

U ukupnom uzorku, prisustvo perforacije membrane timpani je uočeno kod 168 (94,4%), a odsustvo kod 10 (5,6%) ispitanika. Nije uočena statistički značajna razlika između eksperimentalne i kontrolne grupe po pitanju prisustva perforacije membrane timpani (Tabela 46).

**Tabela 46.** Ispitanici prema prisustvu perforacije membrane timpani

	Da	Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Perforacija membrane timpani	N	91	77	168
	%	93,8%	95,1%	94,4%
	N	6	4	10
	%	6,2%	4,9%	5,6%
Ukupno	N	97	81	178
	%	100,0%	100,0%	100,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=0,39$ ,  $p= 0,53$

### 5.10.1.1. Ekspresija TNF-R2 i perforacija membrane timpani

U obje grupe su najzastupljeniji bili ispitanici s umjerenom pozitivnom ekspresijom TNF-R2, koji su imali perforaciju membrane timpani od kojih je 37 (90,2%) pripadalo eksperimentalnoj, a 38 (97,4%) kontrolnoj grupi (Tabela 47). Binarna logistička regresija nije pokazala statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji uticaja na pojavu perforacije membrane timpani.

**Tabela 47. Ekspresija TNF-R2 i perforacija membrane timpani**

Grupa			Perforacija membrane timpani			
			Da		Ne	
			N	%	N	%
Eksperimentalna	TNF-R2 rezultat	Negativan (0)	12	100,0%	0	0,0%
		Slabo pozitivan (1+)	15	88,2%	2	11,8%
		Umjерено pozitivan (2+)	37	90,2%	4	9,8%
		Jako pozitivan (3+)	26	96,3%	1	3,7%
Kontrolna	TNF-R2 Rezultat	Negativan (0)	5	71,4%	2	28,6%
		Slabo pozitivan (1+)	28	96,6%	1	3,4%
		Umjерено pozitivan (2+)	38	97,4%	1	2,6%
		Jako pozitivan (3+)	6	100,0%	0	0,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=1,87$ ,  $p=0,76$

### 5.10.1.2. Ekspresija IL-1 i perforacija membrane timpani

Prema prisustvu perforacije membrane timpani, u obje grupe su najzastupljeniji bili ispitanici s jako pozitivnom ekspresijom IL-1, od kojih je 34 (89,5%) pripadalo eksperimentalnoj, a 43 (95,6%) kontrolnoj grupi. Drugi po učestalosti su bili ispitanici s umjerenom pozitivnom ekspresijom IL-1, od kojih je 33 (91,7%) pripadalo eksperimentalnoj, a 26 (92,9%) kontrolnoj grupi (Tabela 48). Binarna logistička regresija nije pokazala statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji uticaja na pojavu perforacije membrane timpani.

**Tabela 48.** Ekspresija IL-1 i perforacija membrane timpani

Grupa		Perforacija membrane timpani				
		Da		Ne		
		N	%	N	%	
Eksperimentalna	IL-1 rezultat	Negativan (0)	12	100,0%	0	0,0%
		Slabo pozitivan (1+)	11	100,0%	0	0,0%
		Umjeren pozitivan (2+)	33	91,7%	3	8,3%
		Jako pozitivan (3+)	34	89,5%	4	10,5%
Kontrolna	IL-1 rezultat	Negativan (0)	1	100,0%	0	0,0%
		Slabo pozitivan (1+)	7	100,0%	0	0,0%
		Umjeren pozitivan (2+)	26	92,9%	2	7,1%
		Jako pozitivan (3+)	43	95,6%	2	4,4%

*Chi-square test:*  $\chi^2=5,21$ ,  $p=0,27$

#### 5.10.1.3. Ekspresija MMP-9 i perforacija membrane timpani

Po pitanju prisustva perforacije membrane timpani, najveću učestalost u eksperimentalnoj grupi imao je 31 ispitanik s umjerenom (86,1%) i 31 s jako pozitivnom (96,9%) ekspresijom MMP-9, a u kontrolnoj 37 (94,9%) s negativnom ekspresijom MMP-9 (Tabela 49). Binarna logistička regresija nije pokazala statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji uticaja na pojavu perforacije membrane timpani.

**Tabela 49.** Ekspresija MMP-9 i perforacija membrane timpani

Grupa		Perforacija membrane timpani				
		Da		Ne		
		N	%	N	%	
Eksperimentalna	MMP-9 rezultat	Negativan (0)	31	96,9%	1	3,1%
		Slabo pozitivan (1+)	26	96,3%	1	3,7%
		Umjeren pozitivan (2+)	31	86,1%	5	13,9%
		Jako pozitivan (3+)	2	100,0%	0	0,0%
Kontrolna	MMP-9 rezultat	Negativan (0)	37	94,9%	2	5,1%
		Slabo pozitivan (1+)	24	92,3%	2	7,7%
		Umjeren pozitivan (2+)	14	100,0%	0	0,0%
		Jako pozitivan (3+)	2	100,0%	0	0,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=2,24$ ,  $p=0,69$

### 5.10.2. Tip perforacije membrane timpani

U ukupnom uzorku, 87 (51,2 %) ispitanika je imalo ivični, a 81 (48,2%) centralni tip perforacije membrane timpani. Rezultati  $\chi^2$  testa su pokazali da je eksperimentalna grupa imala statistički značajno ( $p<0,01$ ) više ispitanika sa ivičnim tipom u odnosu na kontrolnu u kojoj je uočena statistički značajno veća zastupljenost centralnog tipa perforacije membrane timpani (Tabela 50).

**Tabela 50.** Ispitanici prema tipu perforacije membrane timpani

		Grupa		<b>Ukupno</b>
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Tip perforacije membrane timpani	Ivična	N	71	16
		%	77.2%	21.1%
	Centralna	N	21	60
		%	22.8%	78.9%
Ukupno		N	92	76
		%	100.0%	100.0%
				168
				100.0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=52,5$ ,  $p=0,000$ ;  $p<0,01$

#### 5.10.2.1. Ekspresija TNF-R2 i tip perforacije membrane timpani

Kategorijalna logistička regresija je pokazala statistički značajan uticaj prisustva holesteatoma na pojavu prisustva pojedinih tipova perforacije membrane timpani ( $p<0,01$ ). Ovaj rezultat implicira da postoji veća vjerovatnoća prisustva centralnog tipa perforacije membrane timpani kod ispitanika kontrolne grupe (Tabela 51).

**Tabela 51.** Ekspresija TNF-R2 i tip perforacije membrane timpani

	Standardni koeficijenti		<b>df</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
	Beta	S.E.			
Grupa	,557	,068	1	68,027	,000**
TNF-R2	-,046	,106	1	,189	,664

\*\* $p<0,01$ , TNF-R2 – receptor tumora nekroze alfa, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. -standardna greška regresije; df- broj stepeni slobode; F - test omjera varijanse

### 5.10.2.2. Ekspresija IL-1 i tip perforacije membrane timpani

Kategorijalna logistička regresija je pokazala da oba prediktora imaju statistički značajan uticaj na tip perforacije membrane timpani. Ovaj rezultat implicira da se može očekivati veća vjerovatnoća prisustva ivičnog tipa perforacije membrane timpani kod ispitanika s holesteatomom i jako pozitivne ekspresije IL-1, a u kontrolnoj grupi veća vjerovatnoća centralnog tipa i umjereno pozitivne ekspresije IL-1 (Tabela 52).

**Tabela 52. Ekspresija IL-1 i tip perforacije membrane timpani**

	Standardni koeficijenti		Df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	,579	,061	1	89,760	,000**
IL-1	,167	,055	3	9,103	,000**

\*\* $p < 0,01$ , IL-1 - interleukin – 1, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; F - test omjera varijanse

### 5.10.2.3. Ekspresija MMP-9 i tip perforacije membrane timpani

Kategorijalna logistička regresija je pokazala da oba prediktora imaju statistički značajan uticaj na tip perforacije membrane timpani. Ovaj rezultat implicira da se može očekivati veća vjerovatnoća prisustva ivičnog tipa perforacije membrane timpani kod prisustva holesteatoma i umjereno i slabo pozitivne ekspresije MMP-9, a u kontrolnoj grupi veća vjerovatnoća centralnog tipa i negativne ekspresije MMP-9 (Tabela 53).

**Tabela 53. Ekspresija MMP-9 i tip perforacije membrane timpani**

	Standardni koeficijenti		df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	,566	,064	1	77,546	,000**
MMP-9	,159	,058	3	7,587	,000**

\*\* $p < 0,01$ , MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; F - test omjera varijanse

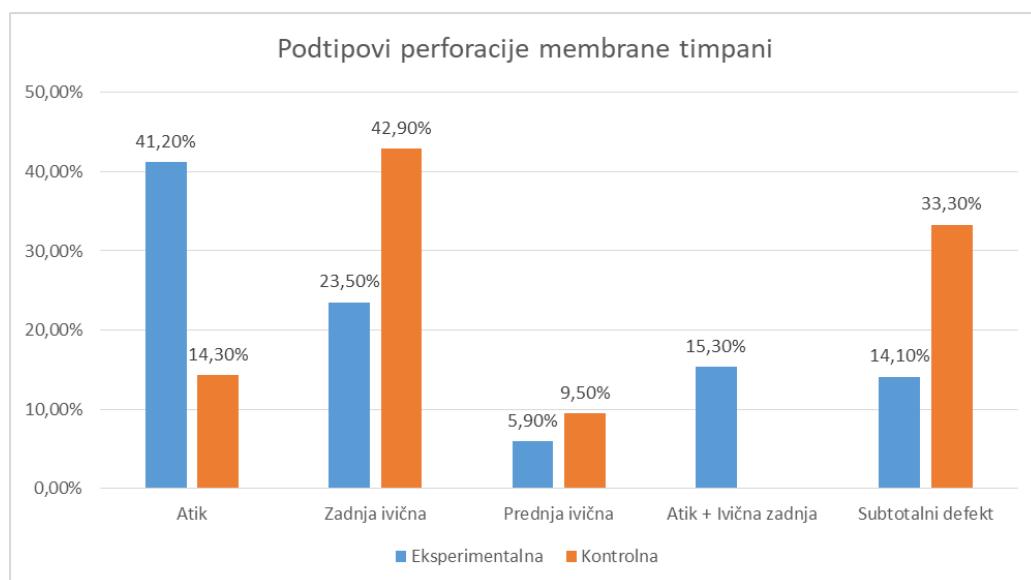
### 5.10.3. Podtip perforacije membrane timpani

Od ukupno 106 ispitanika kod kojih su uočeni pojedini podtipovi perforacije membrane timpani najveću učestalost je pokazalo 38 (35,8%) s atik i 29 (27,4%) sa zadnjom-ivičnom perforacijom membrane timpani (Tabela 54). Postoji statistički značajna razlika između obje grupe po pitanju podtipa perforacije membrane timpani ( $p<0,05$ ), gdje je u eksperimentalnoj bila dominantno zastupljena atik, a u kontrolnoj grupi zadnja-ivična i subtotalni defekt (Slika 17).

**Tabela 54.** Ispitanici prema podtipu perforacije membrane timpani

Podtipovi perforacije membrane timpani			Grupa		Ukupno
			Eksperimentalna	Kontrolna	
	N	%			
Atik	35	35,8%			38
	41,2%	14,3%			
Zadnja ivična	20	27,4%			29
	23,5%	42,9%			
Prednja ivična	5	6,6%			7
	5,9%	9,5%			
Atik +ivična zadnja	13	12,3%			13
	15,3%	0,0%			
Subtotalni defekt	12	17,9%			19
	14,1%	33,3%			
Ukupno	85	100,0%			106
	100,0%	100,0%			

**Chi-square test:**  $\chi^2=12,71$ ,  $p=0,013$ ;  $p<0,05$



**Slika 17.** Ispitanici prema podtipu perforacije membrane timpani

### **5.10.3.1. Ekspresija TNF-R2 i podtip perforacije membrane timpani**

Kategorijalna logistička regresija je pokazala da je prisustvo holesteatoma imalo statistički značajan uticaj na podtip perforacije membrane timpani ( $p<0,01$ ). Ovaj rezultat implicira da postoji veća vjerovatnoća prisustva atik ili zadnjeg - ivičnog podtipa perforacije membrane timpani kod ispitanika s holesteatomom (Tabela 55).

**Tabela 55. Ekspresija TNF-R2 i podtip perforacije membrane timpani**

	Standardni koeficijenti		df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	,338	,118	1	8,202	,005*
TNF-R2	,057	,219	2	,067	,935

\*\* $p<0,01$ , TNF-R2 – receptor tumora nekroze alfa, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; F - test omjera varijanse

### **5.10.3.2. Ekspresija IL-1 i podtip perforacije membrane timpani**

Kategorijalna logistička regresija je pokazala da je prisustvo holesteatoma imalo statistički značajan uticaj na podtip perforacije membrane timpani ( $p<0,01$ ). Ovaj rezultat implicira da postoji veća vjerovatnoća da će kod ispitanika s prisustvom holesteatoma biti prisutan atik ili zadnji - ivični podtip perforacije membrane timpani (Tabela 56).

**Tabela 56. Ekspresija IL-1 i podtip perforacije membrane timpani.**

	Standardni koeficijenti		Df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	,327	,103	1	10,093	,002**
IL-1	,085	,240	1	,125	,724

\*\* $p<0,01$ , IL-1 - interleukin – 1, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; F - test omjera varijanse

### 5.10.3.3. Ekspresija MMP-9 i podtip perforacije membrane timpani

Kategorijalna logistička regresija je pokazala da oba prediktora imaju statistički značajan uticaj na podtip perforacije membrane timpani. Ovaj rezultat implicira da se može očekivati veća vjerovatnoća prisustva atik podtipa perforacije membrane timpani kod holesteatoma i negativne i slabo pozitivne ekspresije MMP-9 (Tabela 57).

**Tabela 57.** Ekspresija MMP-9 i podtip perforacije membrane timpani

	Standardni koeficijenti		df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	,274	,115	1	5,654	,019*
MMP-9	,181	,087	3	4,341	,006**

\* $p<0,05$  , \*\* $p<0,01$ , MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; F - test omjera varijanse

### 5.10.4. Retrakcija membrane timpani

Prisustvo retrakcije membrane timpani u ukupnom uzorku je uočeno kod 42 (23,6%) ispitanika, a odsustvo kod 136 (76,4%). Razlika u distribuciji ispitanika prema prisustvu retrakcije membrane timpani se nije pokazala kao statistički značajna iako je bila relativno niska ( $p=0,07$ ) (Tabela 58).

**Tabela 58.** Ispitanici prema prisustvu retrakcije membrane timpani

		Grupa		Ukupno
		Ekperimentalna	Kontrolna	
Retrakcija membrane timpani	Da	N	28	14
		%	28,9%	17,3%
	Ne	N	69	67
		%	71,1%	82,7%
Ukupno		N	97	81
		%	100,0%	100,0%
				178

**Chi-square test:**  $\chi^2=3,28$ ,  $p=0,07$

#### 5.10.4.1. Ekspresija TNF-R2 i retrakcija membrane timpani

U obje grupe su bili najzastupljeniji ispitanici bez prisustva retrakcije membrane timpani i umjereni pozitivnom ekspresijom TNF-R2 od kojih je 27 (65,9%) pripadalo eksperimentalnoj, a 32 (82,1%) kontrolnoj grupi. Binarna logistička regresija je pokazala da je prisustvo holesteatoma imalo najviše uticaja na pojavu retrakcije membrane timpani ( $p<0,05$ ), a vjerovatnoća da će ispitanici eksperimentalne grupe imati retrakciju membrane timpani je za 2,2 puta veća u odnosu na ispitanike kontrolne (Tabela 59).

**Tabela 59.** Ekspresija TNF-R2 i retrakcija membrane timpani

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	P	Exp(B)	95% C.I.za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Grupa: E/K(1)	,775	,386	4,031	1	,045*	2,170	1,019	4,623
TNFR2			1,747	3	,627			
TNFR2(1)	,612	,698	,769	1	,381	1,845	,469	7,251
TNFR2: slabo pozitivan (1+)	,559	,602	,861	1	,354	1,748	,537	5,688
TNFR2: umjereni pozitivan (2+)	,699	,533	1,723	1	,189	2,012	,708	5,716
Konstanta	-2,165	,568	14,534	1	,000	,115		

\*  $p<0,05$ ; TNF-R2 – receptor tumora nekroze alfa, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, TNFR2, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, Exp (B) – eksponencija B koeficijenta, C.I. – interval povjerenja

#### 5.10.4.2. Ekspresija IL-1 i retrakcija membrane timpani

U obje grupe su bili najzastupljeniji ispitanici bez prisustva retrakcije membrane timpani od kojih je u eksperimentalnoj 29 (76.32%) imalo jaku, a 26 (72.22%) umjereni pozitivnu ekspresiju IL-1. U kontrolnoj grupi 37 (82,1%) ispitanika je imalo jaku, a 22 (78,57%) umjereni pozitivnu ekspresiju IL-1 (Tabela 60). Binarna logistička regresija nije pokazala statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji uticaja na pojavu retrakcije membrane timpani.

**Tabela 60.** Ekspresija IL-1 i retrakcija membrane timpani

Grupa			Retrakcija membrane timpani			
			Da		Ne	
			N	%	N	%
Eksperimentalna	IL-1	Negativan (0)	8	66.67%	4	33.33%
		Slabo pozitivan (1+)	6	54.55%	5	45.45%
		Umjereno pozitivan (2+)	26	72.22%	10	27.78%
		Jako pozitivan (3+)	29	76.32%	9	23.68%
Kontrolna	IL-1	Negativan (0)	1	100.00%	0	0.00%
		Slabo pozitivan (1+)	7	100.00%	0	0.00%
		Umjereno pozitivan (2+)	22	78.57%	6	21.43%
		Jako pozitivan (3+)	37	82.22%	8	17.78%

Chi-square test:  $\chi^2=3,79$ ,  $p=0,43$

#### 5.10.4.3. Ekspresija MMP-9 i retrakcija membrane timpani

U obje grupe su bili najzastupljeniji ispitanici bez prisustva retrakcije membrane timpani od kojih je u eksperimentalnoj 25 (69,4%) imalo umjereno pozitivnu, a kontrolnoj 37 (94,9%) s negativnom ekspresijom MMP-9 (Tabela 61). Binarna logistička regresija nije pokazala statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji uticaja na pojavu retrakcije membrane timpani.

**Tabela 61.** Ekspresija MMP-9 i retrakcija membrane timpani

Grupa			Retrakcija membrane timpani			
			Da		Ne	
			N	%	N	%
Eksperimentalna	MMP-9 rezultat	Negativan (0)	23	71,9%	9	28,1%
		Slabo pozitivan (1+)	19	70,4%	8	29,6%
		Umjereno pozitivan (2+)	25	69,4%	11	30,6%
		Jako pozitivan (3+)	2	100,0%	0	0,0%
Kontrolna	MMP-9 rezultat	Negativan (0)	37	94,9%	2	5,1%
		Slabo pozitivan (1+)	18	69,2%	8	30,8%
		Umjereno pozitivan (2+)	11	78,6%	3	21,4%
		Jako pozitivan (3+)	1	50,0%	1	50,0%

Chi-square test:  $\chi^2=7,14$ ,  $p=0,13$

#### 5.10.5. Destrukcija koštanih zidova zvukovoda i kavuma timpani

Destrukcija koštanih zidova zvukovoda je utvrđena kod 70 (72,2%) ispitanika eksperimentalne i samo 5 (6,2%) kontrolne grupe. Rezultati  $\chi^2$  testa ( $p<0,01$ ), su pokazali da

je eksperimentalna grupa imala statistički značajno više ispitanika s destrukcijom koštanih zidova zvukovoda i kavuma timpani u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 62).

**Tabela 62.** Ispitanici prema prisustvu destrukcije koštanih zidova zvukovoda i kavuma timpani

		Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Destrukcija koštanog zida zvukovoda	Da	N	70	75
		%	72.2%	6.2% 42.1%
	Ne	N	27	76 103
		%	27.8%	93.8% 57.9%
Ukupno		N	97	81 178
		%	100.0%	72.2% 6.2%

*Chi-square test:*  $\chi^2=78,84$ ,  $p=0,000$ ,  $p<0,01$

#### 5.10.5.1. Ekspresija TNF-R2 i destrukcija koštanih zidova zvukovoda i kavuma timpani

Binarna logistička regresija je utvrdila statističku povezanost destrukcije koštanih zidova zvukovoda i kavuma timpani sa prisustvom holesteatoma ( $p<0,01$ ). Vjerovatnoća da će ispitanici s holesteatomom imati opisanu promjenu je bila 45 puta veća nego kod ispitanika kontrolne grupe. Jako pozitivna ekspreacija TNF-R2 u tkivu holesteatoma je pokazala statistički značajno veću vjerovatnoću ( $p<0,01$ ) nastanka koštane destrukcije zidova zvukovoda i kavuma timpani ( $p<0,05$ ). Vjerovatnoća nastanka opisane promjene je bila statistički značajno niža ( $p<0,05$ ) kod ispitanika sa slabo pozitivnom eksprezijom TNF-R2 (Tabela 63).

**Tabela 63.** Ekspreacija TNF-R2 i destrukcija koštanih zidova zvukovoda i kavuma timpani

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Grupa: E/K(1)	3,824	,562	46,231	1	,000**	45,770	15,202	137,804
TNF-R2			12,038	3	,007**			
TNF-R2: negativan (0)	-1,099	,726	2,290	1	,130	,333	,080	1,383
TNF-R2:slabo pozitivan (1+)	-1,604	,650	6,092	1	,014*	,201	,056	,719
TNF-R2: umjereno pozitivan (2+)	,240	,586	,167	1	,683	1,271	,403	4,008
Konstanta	-2,455	,685	12,831	1	,000	,086		

\* $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ ; TNF-R2 – receptor tumora nekroze alfa, a. Variable uključene u step 1: grupa: E/K, TNF-R2, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, Exp (B) - eksponencija B koeficijenta, C.I. - interval povjerenja

### 5.10.5.2. Ekspresija IL-1 i destrukcija koštanih zidova zvukovoda i kavuma timpani

Prediktorski model je utvrdio da je holesteatom statistički značajan prediktor destrukcije koštanih zidova zvukovoda i kavuma timpani ( $p<0,01$ ). Vjerovatnoća da će ispitanici s holesteatomom imati opisanu promjenu bila je 48 puta veća nego kod ispitanika kontrolne grupe. Rezultati ekspresije IL-1 nisu pokazali takav stepen predikcije. (Tabela 64).

**Tabela 64.** Ekspresija IL-1 i destrukcija koštanih zidova zvukovoda i kavuma timpani

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Grupa: E/K(1)	3,873	,545	50,431	1	,000**	48,076	16,509	140,001
IL-1			2,659	3	,447			
IL-1: negativan (0)	-,723	,714	1,027	1	,311	,485	,120	1,965
IL-1: slabo pozitivan (1+)	-,930	,696	1,785	1	,182	,395	,101	1,544
IL-1: umjeren pozitivan (2+)	-,611	,484	1,590	1	,207	,543	,210	1,403
Konstanta	-2,471	,484	26,097	1	,000	,085		

\*\* $p<0,01$ ; IL-1 - interleukin - 1, a. Variable uključene u step 1: grupa: E/K, IL-1, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, Exp (B) – eksponencija B koeficijenta, C.I. - interval povjerenja

### 5.10.5.3. Ekspresija MMP-9 i destrukcija koštanih zidova zvukovoda i kavuma timpani

Binarna logistička regresija je pokazala da je holesteatom statistički značajan prediktor destrukcije koštanih zidova zvukovoda i kavuma timpani ( $p<0,01$ ), za razliku od rezultata ekspresije MMP-9. Vjerovatnoća da će ispitanici s holesteatomom imati opisanu promjenu je 41 puta bila veća nego kod ispitanika kontrolne grupe (Tabela 65).

**Tabela 65.** Ekspresija MMP-9 i destrukcija koštanog zida zvukovoda

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Grupa: E/K(1)	3,716	,537	47,850	1	,000**	41,12	14,346	117,863
MMP-9			7,414	3	,060			
MMP-9: negativan (0)	-,1,627	1,514	1,154	1	,283	,196	,010	3,823
MMP-9:slabo pozitivan (1+)	-,457	1,519	,091	1	,763	,633	,032	12,421
MMP-9:umjeren pozitivan (2+)	-,478	1,523	,098	1	,754	,620	,031	12,271
Konstanta	-1,858	1,488	1,559	1	,212	,156		

\*\* $p<0,01$ ; MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9, a. Variable uključene u step 1: grupa: E/K, IL-1, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, Exp (B) – eksponencija B koeficijenta, C.I. - interval povjerenja

### 5.10.6. Destrukcija osikularnog lanca

U ukupnom uzorku, 83 (46,6%) ispitanika s intaktnim osikularnim lancem ( $O_0$ ) su bili dominantno zastupljeni, a potom po učestalosti slijedi 44 (24,7%) ispitanika s nedostatkom manubriuma maleusa i inkusa te erodiranim suprastrukturama stapesa ( $O_3$ ). Razlika u distribuciji ispitanika prema stepenu destrukcije osikularnog lanca, između eksperimentalne i kontrolne grupe se pokazala statistički značajnom ( $p<0,01$ ). U eksperimentalnoj grupi su najveću učestalost pokazala 42 (43,3%) ispitanika s najtežim stepenom destrukcije osikularnog lanca ( $O_3$ ), dok su 64 (79%) ispitanika s intaktnim osikularnim lancem ( $O_0$ ) u kontrolnoj grupi bila dominantno zastupljena (Tabela 66).

**Tabela 66.** Ispitanici prema prisustvu destrukcije osikularnog lanca

Klasifikacija prema stepenu destrukcije osikularnog lanca	Grupa		Ukupno
	Eksperimentalna	Kontrolna	
$O_0$ - intaktan osikularni lanac	N %	19 19.6%	64 79.0%
$O_1$ - erodiran inkus i destrukcija osikularnog lanca	N %	19 19.6%	30 16.9%
$O_2$ - erodiran inkus i suprastrukture stapesa	N %	17 17.5%	21 11.8%
$O_3$ - manubrium maleusa i inkus nedostaju, erodirane suprastrukture stapesa	N %	42 43.3%	44 24.7%
Ukupno	N %	97 100.0%	178 100.0%

**Chi-square test:**  $\chi^2=70,07$ ,  $p=0,000$ ;  $p<0,01$

### 5.10.6.1. Ekspresija TNF-R2 i destrukcija osikularnog lanca

Prediktorski model koji je uključivao nivo ekspresije TNF-R2 u odnosu na inflamirano tkivo kavuma timpani i tkivo holesteatoma pokazao je da se holesteatom može smatrati statistički značajnim prediktorom ( $p<0,01$ ) višeg stepena destrukcije osikularnog lanca. Uočena je statistički značajna povezanost ( $p<0,05$ ) stepena ekspresije TNF-R2 s destrukcijom osikularnog lanca gdje se kod ispitanika s negativnom ekspresijom TNF-R2 ( $p<0,05$ ) mogu očekivati niži stepeni destrukcije osikularnog lanca (Tabela 67).

**Tabela 67. Ekspresija TNF-R2 i destrukcija osikularnog lanca**

Prediktori	Beta	S.E.	Wald	df	p	95% C.I.	
						Donja granica	Gornja granica
Eksperimentalna grupa	2,788	,371	56,490	1	,000**	2,061	3,515
Kontrolna grupa	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.
TNF-R2: negativan (0)	-1,115	,586	3,624	1	,050*	-2,262	,033
TNF-R2: slabo pozitivan (1+)	-,644	,480	1,801	1	,180	-1,585	,297
TNF-R2: umjерено pozitivan (2+)	-,175	,412	,181	1	,671	-,983	,633
TNF-R2: jako pozitivan (3+)	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.

\*\*  $p<0,01$ ; TNF-R2 – receptor tumora nekroze alfa 9, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, TNF-R2, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; C.I. - interval povjerenja

### 5.10.6.2. Ekspresija IL-1 i destrukcija osikularnog lanca

Prediktorski model koji je uključivao stepen ekspresije IL-1 u odnosu na kontrolno i holesteatomske tkivo, pokazao je da se holesteatom može smatrati statistički značajnim prediktorom ( $p<0,01$ ) višeg stepena destrukcije osikularnog lanca. Uočena je statistički značajna povezanost rezultata ekspresije IL-1 s destrukcijom osikularnog lanca gdje se kod ispitanika s negativnom ( $p<0,01$ ) i slabo pozitivnom ekspresijom IL-1 ( $p<0,05$ ) mogu očekivati niži stepeni destrukcije osikularnog lanca (Tabela 68).

**Tabela 68. Ekspresija IL-1 i destrukcija osikularnog lanca**

Prediktori	Beta	S.E.	Wald	df	p	95% C.I.	
						Donja granica	Gornja granica
Eksperimentalna grupa	3,165	,386	67,315	1	,000**	2,409	3,921
Kontrolna grupa	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.
IL1:negativan (0)	-1,550	,594	6,820	1	,009**	-2,714	-,387
IL1:slabo pozitivan (1+)	-1,084	,559	3,769	1	,050*	-2,179	,010
IL1:umjereno pozitivan (2+)	-,611	,356	2,953	1	,086	-1,309	,086
IL1:jako pozitivan (3+)	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.

\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ ; IL-1 - interleukin - 1, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, IL-1, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; C.I. - interval povjerenja

#### 5.10.6.3. Ekspresija MMP-9 i destrukcija osikularnog lanca

Prediktorski model koji je uključivao stepen ekspresije MMP-9 u odnosu na kontrolno i holesteatomsko tkivo, pokazao je da se holesteatom može smatrati statistički značajnim prediktorom ( $p<0,01$ ) višeg stepena destrukcije osikularnog lanca. U odnosu na nivoje ekspresije MMP-9, nije uočena statistički značajna povezanost s destrukcijom osikularnog lanca (Tabela 69).

**Tabela 69. Ekspresija MMP-9 i destrukcija osikularnog lanca**

Prediktori	Beta	S.E.	Wald	df	p	95% C.I.	
						Donja granica	Gornja granica
Eksperimentalna grupa	2,714	,363	55,962	1	,000**	2,003	3,425
Kontrolna grupa	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.
MMP-9: negativan (0)	-1,235	1,026	1,450	1	,229	-3,245	,775
MMP-9: slabo pozitivan (1+)	-,556	1,028	,293	1	,588	-2,570	1,458
MMP-9: umjereno pozitivan (2+)	,018	1,028	,000	1	,986	-1,998	2,034
MMP-9: jako pozitivan (3+)	0 <sup>a</sup>	.	.	0	.	.	.

\*\* $p<0,01$ , MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, MMP-9, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; C.I. - interval povjerenja

#### 5.10.7. Sluznica kavuma timpani

Od ukupno 151 (84,8%) ispitanika s patološki izmijenjenom sluznicom kavuma timpani, najveću učestalost je pokazalo 76 (42,7%) ispitanika s granulacijama i 67 (37,6%) s hipertrofijom sluznice. Razlika u procentualnoj distribuciji ispitanika prema stanju sluznice

kavuma timpani između obje grupe se pokazala kao statistički značajna ( $p<0,01$ ) gdje je u kontrolnoj grupi najveću učestalost pokazalo 43,2% ispitanika s hipertrofijom sluznice, a u eksperimentalnoj 56,7% s granulacijama (Tabela 70).

**Tabela 70.** Ispitanici prema stanju sluznice kavuma timpani

		Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Sluznica kavuma timpani	Eutrofična	N	3	27
		%	3.1%	15.2%
	Hipertrofična	N	32	67
		%	33.0%	37.6%
	Granulacije	N	55	76
		%	56.7%	42.7%
Polipodna izmijenjena	N	7	1	8
	%	7.2%	1.2%	4.5%
Ukupno	N	97	81	178
	%	100.0%	100.0%	100.0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=35,23$ ,  $p=0,000$ ;  $p<0,01$

#### 5.10.7.1. Ekspresija TNF-R2 i sluznica kavuma timpani

Prediktorski model koji je obuhvatao stepen ekspresije TNF-R2 u odnosu na holesteatomsko i kontrolno tkivo pokazao je da se holesteatom može smatrati statistički značajnim prediktorom ( $p<0,01$ ) patoloških promjena na sluznici kavuma timpani, odnosno pojave hipertrofije sluznice i granulacija. Klasifikacija prema rezultatima ekspresije TNF-R2 je imala statistički značajan uticaj ( $p<0,01$ ) na vjerovatnoću pojave patološki izmijenjene sluznice kavuma timpani. Kod slabo i umjerenog pozitivne ekspresije TNF-R2 može se očekivati veća vjerovatnoća prisustva hipertrofije sluznice i granulacija (Tabela 71).

**Tabela 71.** Ekspresija TNF-R2 i sluznica kavuma timpani

	Standardni koeficijenti		df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	-,414	,073	2	32,195	,000**
TNF-R2	,173	,076	4	5,229	,001**

\*\*  $p<0,01$ , TNF-R2 – receptor tumora nekroze alfa, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; F - test omjera varijanse

#### 5.10.7.2. Ekspresija IL-1 i sluznica kavuma timpani

Prediktorski model koji je obuhvatao stepen ekspresije IL-1 u odnosu na holesteatomsko i kontrolno tkivo pokazao je da se holesteatom može smatrati statistički značajnim

prediktorom ( $p<0,01$ ) patoloških promjena na sluznici kavuma timpani, odnosno pojave hipertrofije sluznice i granulacija. Klasifikacija prema rezultatima ekspresije IL-1 je imala statistički značajan uticaj ( $p<0,01$ ) na vjerovatnoću pojave patološki izmijenjene sluznice kavuma timpani. Kod umjerenog i jako pozitivne ekspresije IL-1 može se očekivati veća vjerovatnoća prisustva hipertrofije sluznice i granulacija (Tabela 72).

**Tabela 72. Ekspresija IL-1 i sluznica kavuma timpani**

	Standardni koeficijenti		df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	-,473	,059	1	64,357	,000**
IL-1	,222	,065	3	11,705	,000**

\*\*  $p<0,01$ , IL-1 - interleukin – 1, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; F - test omjera varijanse

#### **5.10.7.3. Ekspresija MMP-9 i sluznica kavuma timpani**

Prediktorski model koji je obuhvatao stepen ekspresije MMP-9 u odnosu na holesteatomsko i kontrolno tkivo pokazao je da se holesteatom može smatrati statistički značajnim prediktorom ( $p<0,01$ ) patoloških promjena na sluznici kavuma timpani, odnosno pojave hipertrofije sluznice i granulacija. Klasifikacija prema rezultatima ekspresije MMP-9 je imala statistički značajan uticaj ( $p<0,01$ ) na vjerovatnoću pojave patološki izmijenjene sluznice kavuma timpani. Kod umjerenog pozitivne ekspresije MMP-9 može se očekivati veća vjerovatnoća prisustva granulacija (Tabela 73).

**Tabela 73. Ekspresija MMP-9 i sluznica kavuma timpani**

	Standardni koeficijenti		df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	-,386	,091	1	18,028	,000**
MMP-9	,333	,116	3	8,296	,000**

\*\*  $p<0,01$ , MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; F - test omjera varijanse

### 5.10.8. Status timpanalnog ušća Eustahijeve tube

U ukupnom uzorku, timpanalno ušće Eustahijeve tube je bilo prohodno kod 92 (51,7%) ispitanika, za razliku od 86 (48,3%) kod kojih takav slučaj nije zabilježen. Analiza  $\chi^2$  testom je utvrdila statistički značajnu razliku ( $p<0,01$ ) između ispitanika obje grupe po pitanju prohodnosti timpanalnog ušća Eustahijeve tube gdje su procentualno u eksperimentalnoj grupi dominantno bili zastupljeni ispitanici s opstruisanim (66%), a u kontrolnoj s prohodnim timpanalnim ušćem Eustahijeve tube (72,8%) (Tabela 74).

**Tabela 74.** Ispitanici u odnosu na prohodnost timpanalnog ušća Eustahijeve tube

		Grupa		Ukupno	
		Eksperimentalna	Kontrolna		
Prohodnost Eustahijeve tube	Prohodna	N	33	92	
		%	34,0%	51,7%	
	Neprohodna	N	64	86	
		%	66,0%	48,3%	
Ukupno		N	97	178	
		%	100,0%	100,0%	

**Chi-square test:**  $\chi^2=26,63$ ,  $p=0,000$ ;  $p<0,01$

#### 5.10.8.1. Ekspresija TNF-R2 i prohodnost timpanalnog ušća

Prediktorski model, koji je uključio rezultate ekspresije TNF-R2 u odnosu na holesteatomsko i kontrolno tkivo, dokazao je statistički značajan uticaj prisustva holesteatoma na prohodnost timpanalnog ušća Eustahijeve tube ( $p<0,01$ ), a vjerovatnoća da će ispitanici s holesteatomom imati prohodno ušće je bila za 2,2 puta manja u odnosu na kontrolnu grupu. Klasifikacija prema rezultatima ekspresije TNF-R2 je imala statistički značajan uticaj ( $p<0,05$ ) na prohodnost timpanalnog ušća, gdje je vjerovatnoća prohodnosti za 3,6 puta bila veća kod slabo pozitivne ekspresije TNF-R2 u odnosu na rezultat jako pozitivne, koji je bio konstanta u statističkoj obradi (Tabela 75).

**Tabela 75.** Ekspresija TNF-R2 i prohodnost timpanalnog ušća

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Grupa: E/K(1)	-1,491	,343	18,863	1	,000**	,225	,115	,441
TNF-R2			6,901	3	,075			
TNF-R2(1)	1,137	,639	3,170	1	,075	3,118	,892	10,906
TNF-R2: slabo pozitivan (1+)	1,291	,539	5,747	1	,017*	3,638	1,266	10,457
TNF-R2: umjereni pozitivan (2+)	,586	,480	1,491	1	,222	1,797	,701	4,604
Konstanta	,180	,483	,139	1	,709	1,197		

\*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; TNF-R2 – receptor tumora nekroze alfa, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, TNF-R2, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - broj stepeni slobode, Exp (B) – eksponencija B koeficijenta, C.I. - interval povjerenja

### 5.10.8.2. Ekspresija IL-1 i prohodnost timpanalnog ušća

Prediktorski model koji je obuhvatao rezultate ekspresije IL-1 u odnosu na holesteatomsko i kontrolno tkivo je dokazao statistički značajan prediktivni uticaj prisustva holesteatoma na prohodnost timpanalnog ušća ( $p<0,01$ ), a vjerovatnoća da će ispitanici s holesteatomom imati prohodno ušće je bila za 2,2 puta manja u odnosu na kontrolnu grupu. Klasifikacija ispitanika prema rezultatima ekspresije IL-1 je imala statistički značajan efekat za sve kategorije ekspresije. Kod negativne ekspresije IL-1, nivo vjerovatnoće za prohodnost timpanalnog ušća je bio za 5,7 puta veći, u slučaju slabo pozitivne za 3,3, a kod umjerenog pozitivne za 2,3 puta u odnosu na jako pozitivnu ekspresiju, iz čega se može zaključiti da se na IL-1 skali smanjuje vjerovatnoća prohodnosti timpanalnog ušća (Tabela 76).

**Tabela 76.** Ekspresija IL-1 i prohodnost timpanalnog ušća

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Grupa: E/K(1)	-2,002	,368	29,573	1	,000**	,135	,066	,278
IL-1			9,844	3	,020*			
IL-1: negativan (0)	1,741	,667	6,805	1	,009**	5,703	1,542	21,094
IL-1: slabo pozitivan (1+)	1,186	,602	3,888	1	,049*	3,274	1,007	10,645
IL-1: umjereni pozitivan (2+)	,836	,389	4,616	1	,032*	2,307	1,076	4,948
Konstanta	,627	,283	4,898	1	,027	1,872		

\*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; IL-1 - interleukin – 1, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, IL-1, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - broj stepeni slobode, Exp (B) – eksponencija B koeficijenta, C.I. - interval povjerenja

### 5.10.8.3. Ekspresija MMP-9 i prohodnost timpanalnog ušća Eustahijeve tube

Prediktorski model je dokazao statistički značajnu predikciju prisustva holesteatoma na prohodnost timpanalnog ušća ( $p<0,01$ ), a vjerovatnoća da će ispitanici s holesteatomom imati prohodno ušće je bila za 0,2 puta manja u odnosu na kontrolnu grupu. Klasifikacija ispitanika prema rezultatima ekspresije MMP-9 je imala statistički značajan uticaj ( $p<0,01$ ) za sve kategorije ekspresije. Kod negativne, slabo i umjerenog pozitivnog ekspresije MMP-9 postoji statistički značajno veća vjerovatnoća da će timpanalno ušće Eustahijeve tube biti prohodno u odnosu na rezultat samo pozitivne ekspresije MMP-9, koja je bila konstanta u statističkoj obradi. Niska distribucija ispitanika s neprohodnom Eustahijevom tubom u kontrolnoj grupi nije dozvolila izračunavanje pojedinačnih koeficijenata prediktora MMP-9 prema kategorijama ekspresije (Tabela 77).

**Tabela 77. Ekspresija MMP-9 i prohodnost timpanalnog ušća Eustahijeve tube**

	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Prediktori u modelu <sup>a</sup>	Grupa: E/K(1)	-1,574	,361	18,958	1 ,000**	,207	,102	,421
	MMP-9			20,098	3 ,000**			

\*\* $p<0,01$ , MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, Exp (B) - eksponencija B koeficijenta, C.I. - interval povjerenja

## 5.11. Imunohistohemijske karakteristike holesteatoma srednjeg uha

### 5.11.1. Holesteatom srednjeg uha i ekspresija medijatora inflamacije

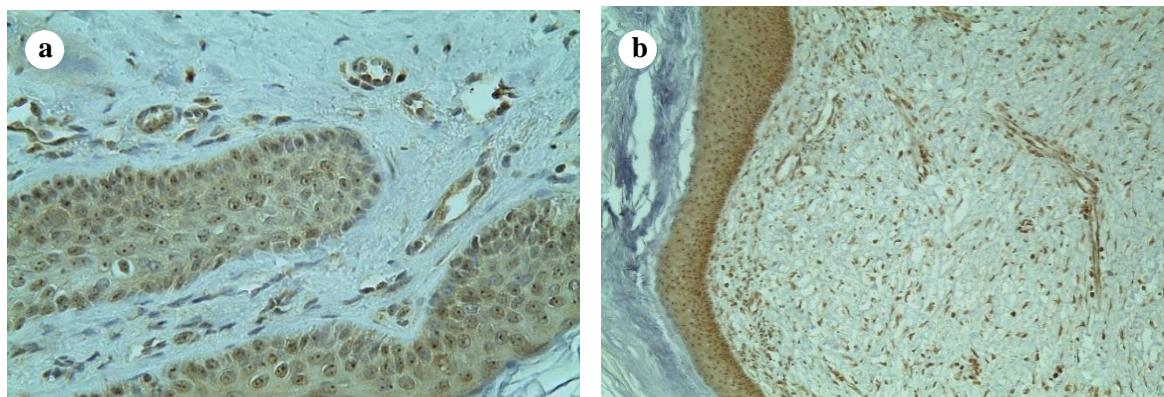
#### 5.11.1.1. Ekspresija TNF-R2 i holesteatom srednjeg uha

U eksperimentalnoj grupi, procentualno najzastupljeniji su bili ispitanici s umjerenom pozitivnom (42,3%) i jako pozitivnom (27,8%) ekspresijom TNF-R2, dok su u kontrolnoj grupi najveću procentualnu zastupljenost pokazali ispitanici s umjerenom pozitivnom (48,1%) i slabo pozitivnom (35,8%) ekspresijom TNF-R2. Primjenom  $\chi^2$  testa utvrđena je statistički značajna razlika ( $p<0,01$ ) u procentualnoj distribuciji ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe prema rezultatima ekspresije TNF-R2. Učestalost jako pozitivne ekspresije TNF-R2 u eksperimentalnoj grupi (27,8%) je bila veća u odnosu na kontrolnu (7,4%), dok je u kontrolnoj grupi slabo pozitivna ekspresija TNF-R2 (35,8%) pokazala veću učestalost u odnosu na eksperimentalnu (17,5%) (Tabela 78) (Slike 18 i 19).

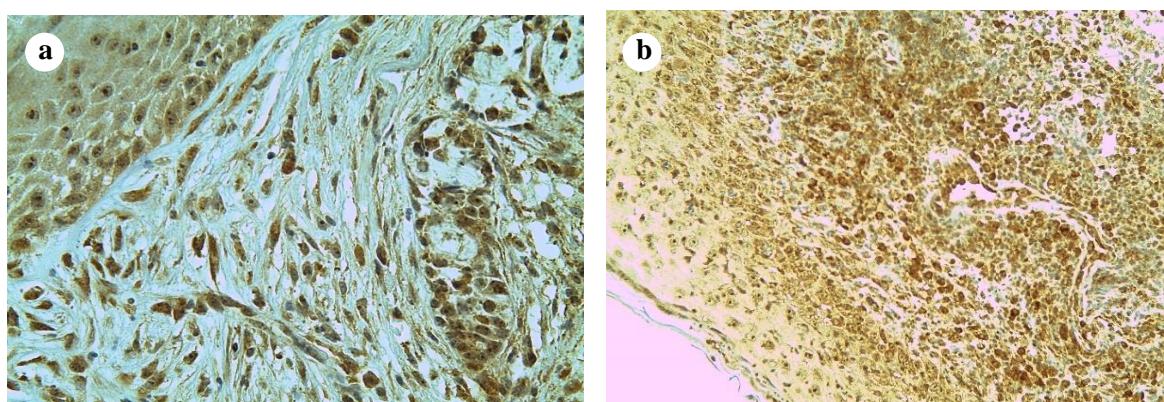
**Tabela 78. Ekspresija TNF-R2 i holesteatom srednjeg uha**

Rezultati ekspresije TNF-R2	Grupa			Ukupno
	Eksperimentalna	Kontrolna		
Negativan (0)	N	12	7	19
	%	12,4%	8,6%	10,7%
Slabo pozitivan (1+)	N	17	29	46
	%	17,5%	35,8%	25,8%
Umjereno pozitivan (2+)	N	41	39	80
	%	42,3%	48,1%	44,9%
Jako pozitivan (3+)	N	27	6	33
	%	27,8%	7,4%	18,5%
Ukupno	N	97	81	178
	%	100,0%	100,0%	100,0%

**Chi-square test:**  $\chi^2=16,55$ ,  $p=0,001$ ;  $p < 0,01$



**Slika 18.** Prikaz negativne ekspresije ( $R=0$ ) TNF-R2 (a) i slabo pozitivne ekspresije ( $R=1+$ ) TNF-R2 (b) u stromalnim i upalnim ćelijama u okolini holesteatoma (anti-TNF-R2-1x400)



**Slika 19.** Prikaz umjereno pozitivne ekspresije ( $R=2+$ ) TNF-R2 (a) i jako pozitivne ekspresije ( $R=3+$ ) TNF-R2 (b) u stromalnim i upalnim ćelijama u okolini holesteatoma (anti-TNF-R2 -1x400)

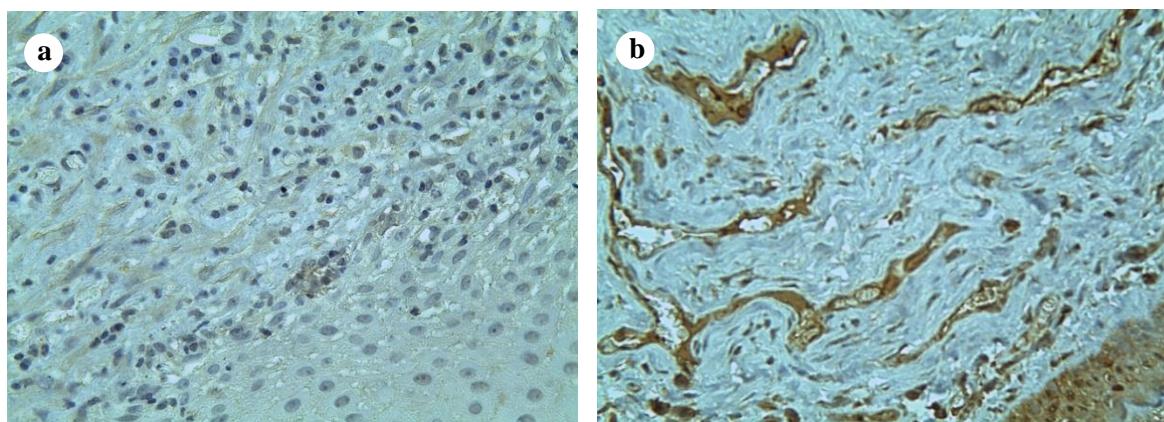
### 5.11.1.2. Ekspresija IL-1 i holesteatom srednjeg uha

U eksperimentalnoj grupi najveću procentualnu učestalost su pokazali ispitanici sa jako pozitivnom (39,2%) i umjereno pozitivnom (37,1%), a u kontrolnoj ispitanici s jako pozitivnom (55,6%) i umjereno pozitivnom (34,6%) ekspresijom IL-1. Primjenom  $\chi^2$  testa utvrđena je statistički značajna razlika ( $p<0,05\%$ ) u procentualnoj distribuciji ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe prema rezultatima ekspresije IL-1. Učestalost jako pozitivne ekspresije IL-1 u kontrolnoj grupi (55,6%) je bila veća nego u eksperimentalnoj (39,2%). Učestalost negativne ekspresije IL-1 u eksperimentalnoj grupi (12,4%) je bila veća nego u kontrolnoj (1,2%) (Tabela 79) (Slike 20 i 21).

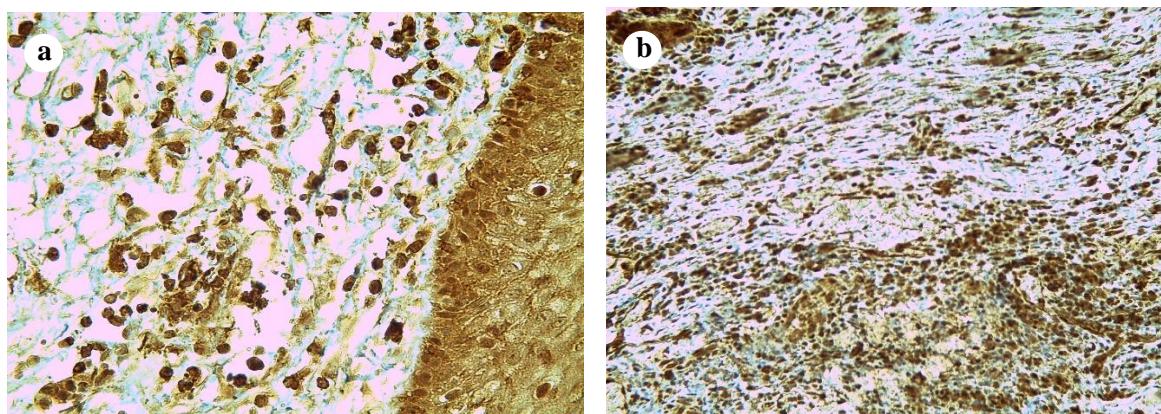
**Tabela 79.** Ekspresija IL-1 i holesteatom srednjeg uha

Rezultati ekspresije IL-1		Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
		N	1	
Negativan (0)		12	1	13
	%	12.4%	1.2%	7.3%
Slabo pozitivan (1+)		11	7	18
	%	11.3%	8.6%	10.1%
Umjereno pozitivan (2+)		36	28	64
	%	37.1%	34.6%	36.0%
Jako pozitivan (3+)		38	45	83
	%	39.2%	55.6%	46.6%
Ukupno		97	81	178
	%	100.0%	100.0%	100.0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=10,43$ ,  $p=0,015$ ;  $p<0,05$



**Slika 20.** Prikaz negativne ekspresije ( $R=0$ ) IL-1 (a) i slabo pozitivne ekspresije ( $R=3+$ ) IL-1 (b) u stromalnim i upalnim ćelijama u okolini holesteatoma (anti-IL-1x400).



**Slika 21.** Prikaz umjereno pozitivne ekspresije ( $R=2+$ ) IL-1 (a) i jako pozitivne ekspresije ( $R=3+$ ) IL-1 (b) u stromalnim i upalnim ćelijama u okolini holesteatoma (anti-IL-1x400).

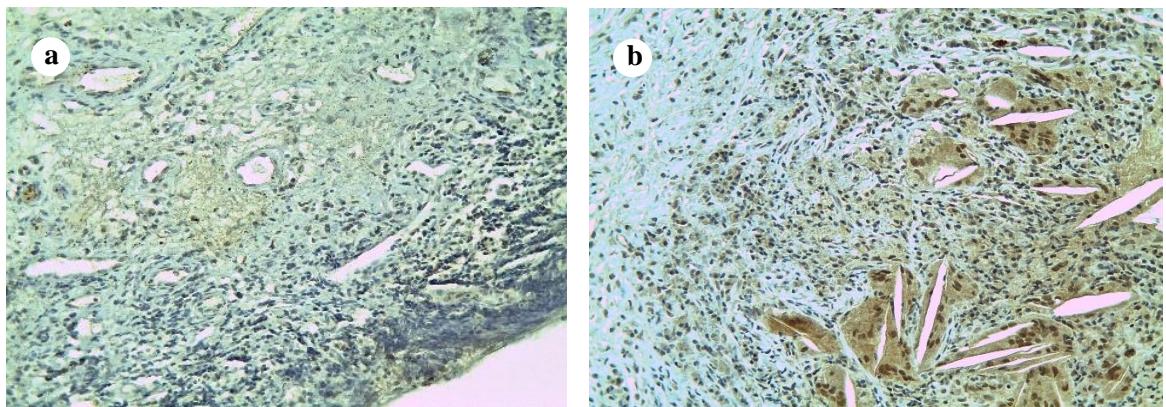
#### 5.11.1.3. Ekspresija MMP-9 i holesteatom srednjeg uha

U eksperimentalnoj grupi najveću i relativno izbalansiranu procentualnu učestalost su pokazali ispitanici s umjereno pozitivnom (37,1%), negativnom (33,0%) i slabo pozitivnom (27,8%) ekspresijom MMP-9. U kontrolnoj grupi su najveću učestalost pokazali ispitanici s negativnom (48,1%) i slabo pozitivnom (32,1%) ekspresijom MMP-9. Primjenom  $\chi^2$  testa utvrđena je statistički značajna razlika ( $p<0,05$ ) u procentualnoj distribuciji ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe prema rezultatima ekspresije MMP-9. Učestalost umjereno pozitivne ekspresije MMP-9 u eksperimentalnoj grupi (37,1%) je bila veća nego u kontrolnoj (17,3%), dok je u kontrolnoj grupi negativna ekspresija MMP-9 (48,1%) bila veća nego u eksperimentalnoj grupi (33,3%) (Tabela 80) (Slike 22 i 23).

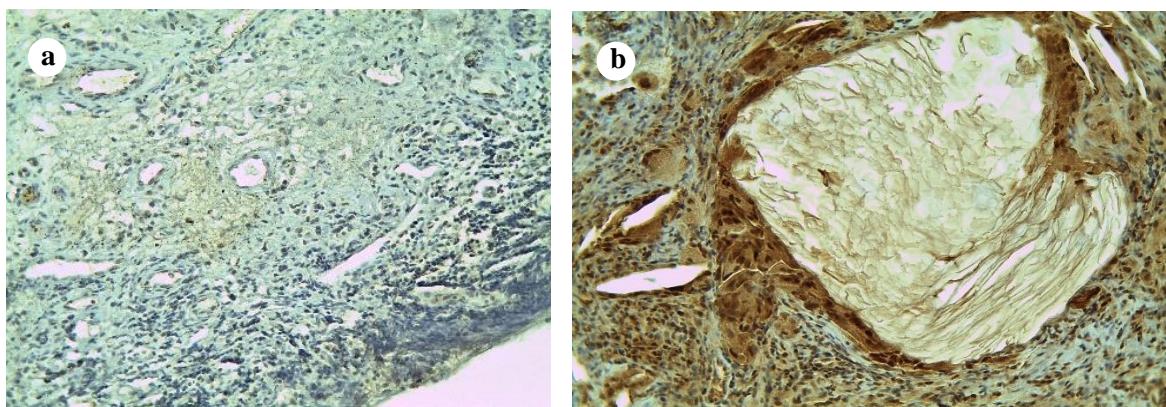
**Tabela 80.** Ekspresija MMP-9 i holesteatom srednjeg uha

		Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Rezultati ekspresije MMP-9	Negativan (0)	N	32	39
		%	33,0%	48,1%
	Slabo pozitivan (1+)	N	27	26
		%	27,8%	32,1%
	Umjereno pozitivan (2+)	N	36	14
		%	37,1%	17,3%
	Jako pozitivan (3+)	N	2	2
		%	2,1%	2,5%
Ukupno		N	97	81
		%	100,0%	100,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=9,02$ ,  $p=0,029$ ;  $p<0,05$



Slika 22. Prikaz negativne ekspresije ( $R=0$ ) MMP-9 (a) i slabo pozitivne ekspresije ( $R=1+$ ) MMP-9 (b) u stromalnim i upalnim ćelijama u okolini holesteatoma (anti-MMP9x400)



Slika 23. Prikaz umjereno pozitivne ekspresije ( $R=2+$ ) MMP-9 (a) i jako pozitivne ekspresije ( $R=3+$ ) MMP-9 (b) u stromalnim i upalnim ćelijama u okolini holesteatoma (anti-MMP9x400)

## 5.11.2. Tip holesteatoma

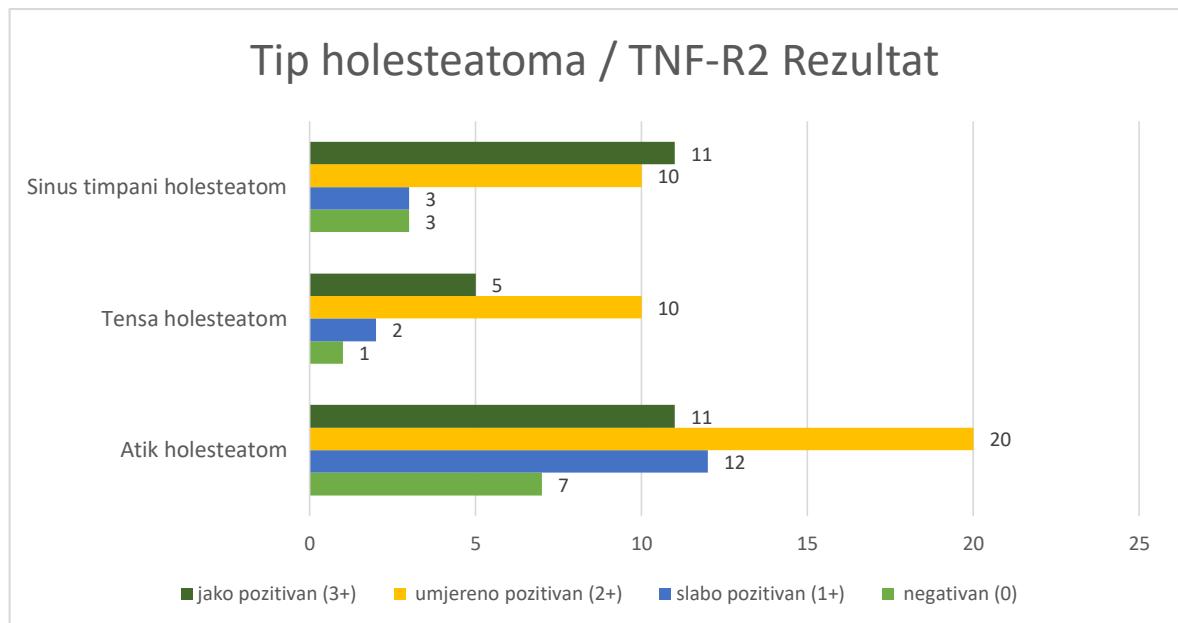
### 5.11.2.1. Ekspresija TNF-R2 i tip holesteatoma

Rezultati  $\chi^2$  testa su pokazali da u eksperimentalnoj grupi nije postojala statistički značajna razlika ( $p>0,05$ ) po pitanju distribucije pojedinih tipova holesteatoma (atik, tensa i sinus timpani) u odnosu na rezultate ekspresije TNF-R2 (Tabela 81). Distribucija na grafikonu pokazuje da je umjereno pozitivna ekspresija TNF-R2 bila najučestalija kod atik (50,0%), a jako pozitivna kod sinus timpani i atik tipa holesteatoma (Slika 24).

**Tabela 81.** Ekspresija TNF-R2 prema tipu holesteatoma srednjeg uha

		Rezultat ekspresije TNF-R2				
		Negativan (0)	Slabo pozitivan (1+)	Umjereno pozitivan (2+)	Jako pozitivan (3+)	Ukupno
Tip holesteatoma	Atik holesteatom	N %	7 63,6%	12 70,6%	20 50,0%	11 40,7%
	Tensa holesteatom	N %	1 9,1%	2 11,8%	10 25,0%	5 18,5%
	Sinus timpani holesteatom	N %	3 27,3%	3 17,6%	10 25,0%	11 40,7%
	Ukupno		N %	11 100,0%	17 100,0%	40 100,0%
					27 100,0%	95 100,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=6,181$ ,  $p=0,430$



**Slika 24.** Ekspresija TNF-R2 prema tipu holesteatoma srednjeg uha

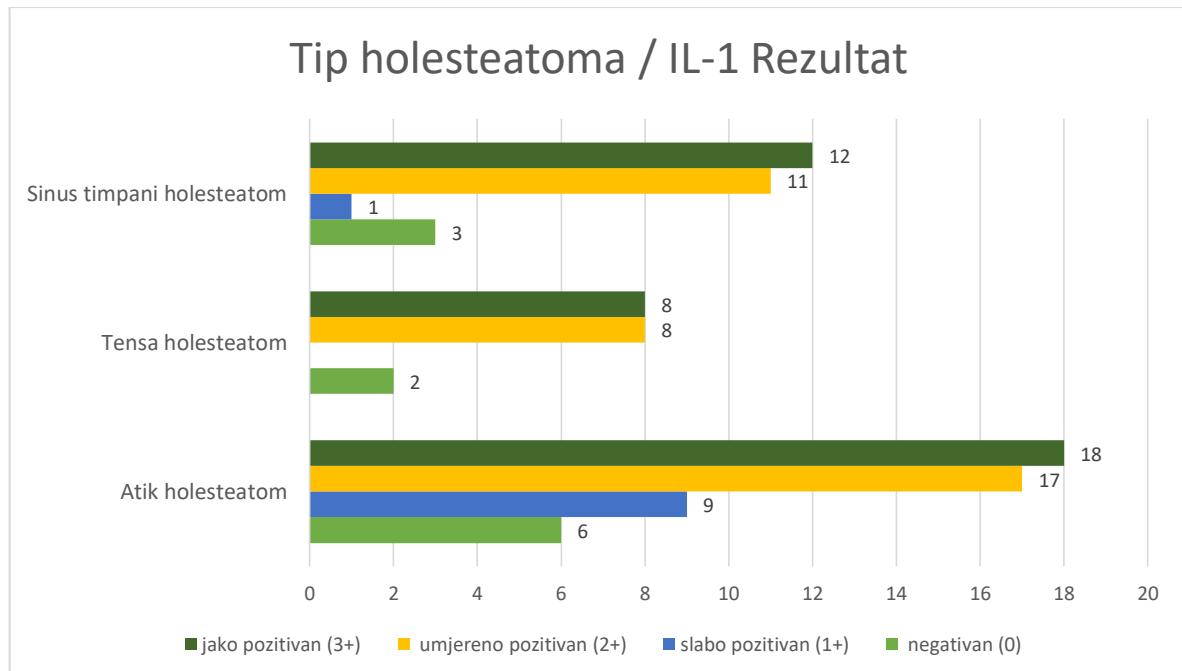
### 5.11.2.2. Ekspresija IL-1 i tip holesteatoma

Rezultati  $\chi^2$  testa su pokazali da u eksperimentalnoj grupi nije postojala statistički značajna razlika ( $p>0,05$ ) po pitanju distribucije pojedinih tipova holesteatoma (atik, tensa i sinus timpani) u odnosu na rezultate ekspresije IL-1 (Tabela 82). Iako nije bila statistički značajna, distribucija na grafikonu pokazuje da su umjereno i jako pozitivni rezultati ekspresije IL-1 bili najzastupljeniji kod ispitanika sa sinus timpani, tensa i atik tipom holesteatoma (Slika 25).

**Tabela 82. Ekspresija IL-1 prema tipu holesteatoma srednjeg uha**

		Rezultat ekspresije IL-1				
		Negativan (0)	Slabo pozitivan (1+)	Umjereno pozitivan (2+)	Jako pozitivan (3+)	Ukupno
Tip holesteatoma	Atik holesteatom	N %	6 54,5%	9 90,0%	17 47,2%	18 47,4%
	Tensa holesteatom	N %	2 18,2%	0 0,0%	8 22,2%	8 21,1%
	Sinus timpani holesteatom	N %	3 27,3%	1 10,0%	11 30,6%	12 31,6%
	Ukupno	N %	11 100,0%	10 100,0%	36 100,0%	38 100,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=6,642$ ,  $p=0,355$



**Slika 25. Ekspresija IL-1 prema tipu holesteatoma srednjeg uha**

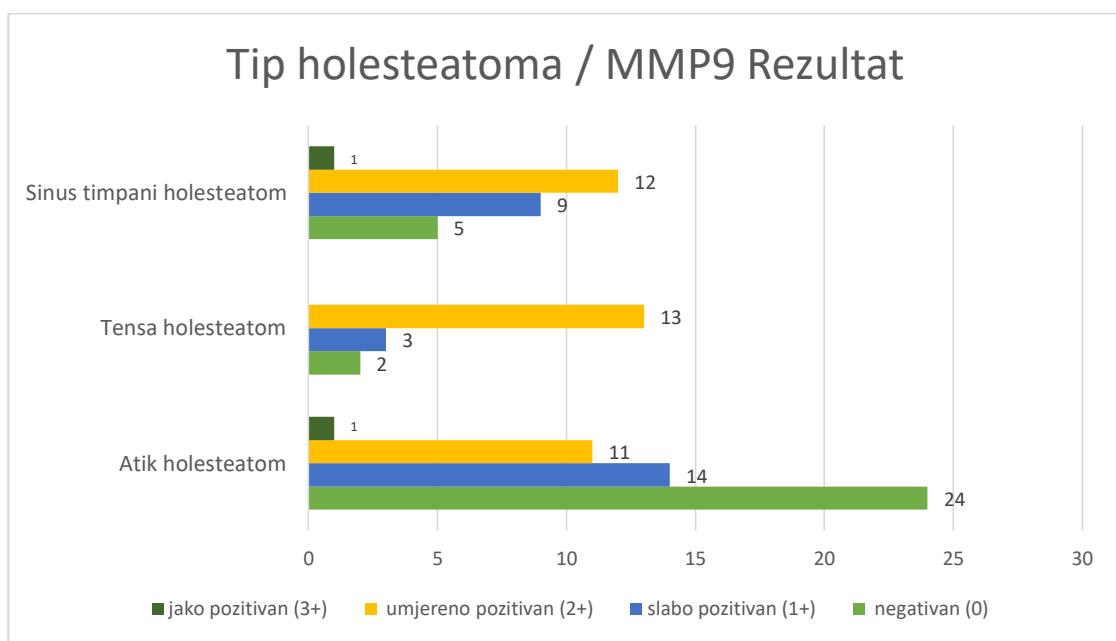
### 5.11.2.3. Ekspresija MMP-9 i tip holesteatoma

Rezultati  $\chi^2$  testa su pokazali da je u eksperimentalnoj grupi postojala statistički značajna razlika ( $p<0,01$ ) po pitanju distribucije pojedinih tipova holesteatoma (atik, tensa i sinus timpani) u odnosu na rezultate ekspresije MMP-9 (Tabela 83). Distribucija na grafikonu pokazuje da su umjereno pozitivni rezultati ekspresije MMP-9 bili najzastupljeniji kod ispitanika sa sinus timpani i tensa tipom holesteatoma. Negativni rezultati ekspresije MMP-9 su pokazali najveću učestalost kod ispitanika s atik tipom holesteatoma (Slika 26).

**Tabela 83.** Ekspresija MMP-9 prema tipu holesteatoma srednjeg uha

Tip holesteatoma	Rezultat ekspresije MMP-9				Ukupno	
	Negativan (0)	Slabo pozitivan (1+)	Umjereno pozitivan (2+)	Jako pozitivan (3+)		
Atik holesteatom	N %	24 77,4%	14 53,8%	11 30,6%	1 50,0%	50 52,6%
Tensa holesteatom	N %	2 6,5%	3 11,5%	13 36,1%	0 0,0%	18 18,9%
Sinus timpani holesteatom	N %	5 16,1%	9 34,6%	12 33,3%	1 50,0%	27 28,4%
Ukupno	N %	31 100,0%	26 100,0%	36 100,0%	2 100,0%	95 100,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=18,88$ ,  $p=0,004$ ;  $p<0,01$



**Slika 26.** Ekspresija MMP-9 prema tipu holesteatoma srednjeg uha

### 5.11.3. Lokalizacija i proširenost holesteatoma

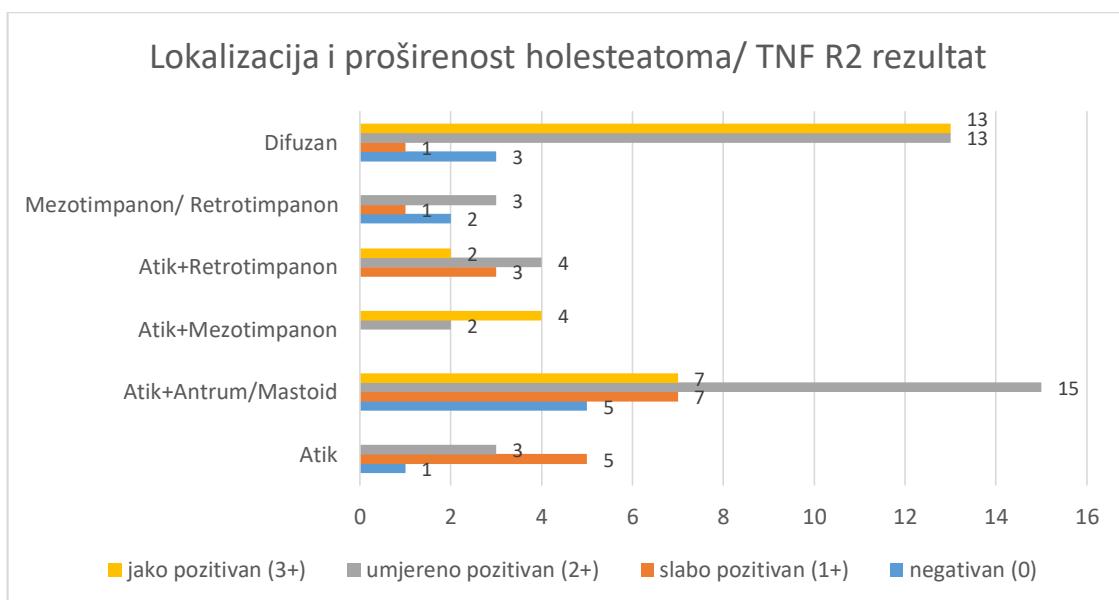
#### 5.11.3.1. Ekspresija TNF-R2 i lokalizacija i proširenost holesteatoma

Rezultati  $\chi^2$  testa su pokazali da u eksperimentalnoj grupi postoji statistički značajna razlika ( $p<0,05$ ) pojedinih tipova lokalizacije i proširenosti holesteatoma u odnosu na rezultate ekspresije TNF-R2. Distribucija u tabeli i grafikonu pokazuje da je umjereno pozitivna ekspresija TNF-R2 bila dominantno zastupljena kod holesteatoma lokalizovanog u području atika i antruma i/ili mastoidnog nastavka, a umjereno i jako pozitivna kod difuzno proširenog (Tabela 84, Slika 27).

**Tabela 84.** Ekspresija TNF-R2 prema lokalizaciji i proširenosti holesteatoma

Lokalizacija i proširenost holesteatoma	Rezultat ekspresije TNF-R2				Ukupno	
	Negativan (0)	Slabo pozitivan (1+)	Umjereno pozitivan (2+)	Jako pozitivan (3+)		
Atik	N %	1 9,1%	5 29,4%	3 7,5%	0 0,0%	9 9,6%
Atik+Antrum/mastoid	N %	5 45,5%	7 41,2%	15 37,5%	7 26,9%	34 36,2%
Atik+mezotimpanon	N %	0 0,0%	0 0,0%	2 5,0%	4 15,4%	6 6,4%
Atik+retrotimpanon	N %	0 0,0%	3 17,6%	4 10,0%	2 7,7%	9 9,6%
Mezotimpanon/ Retrotimpanon	N %	2 18,2%	1 5,9%	3 7,5%	0 0,0%	6 6,4%
Difuzan	N %	3 27,3%	1 5,9%	13 32,5%	13 50,0%	30 31,9%
Ukupno	N %	11 100,0%	17 100,0%	40 100,0%	26 100,0%	94 100,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=28,69$ ,  $p=0,018$ ;  $p<0,05$



**Slika 27.** Ekspresija TNF-R2 prema lokalizaciji i proširenosti holesteatoma

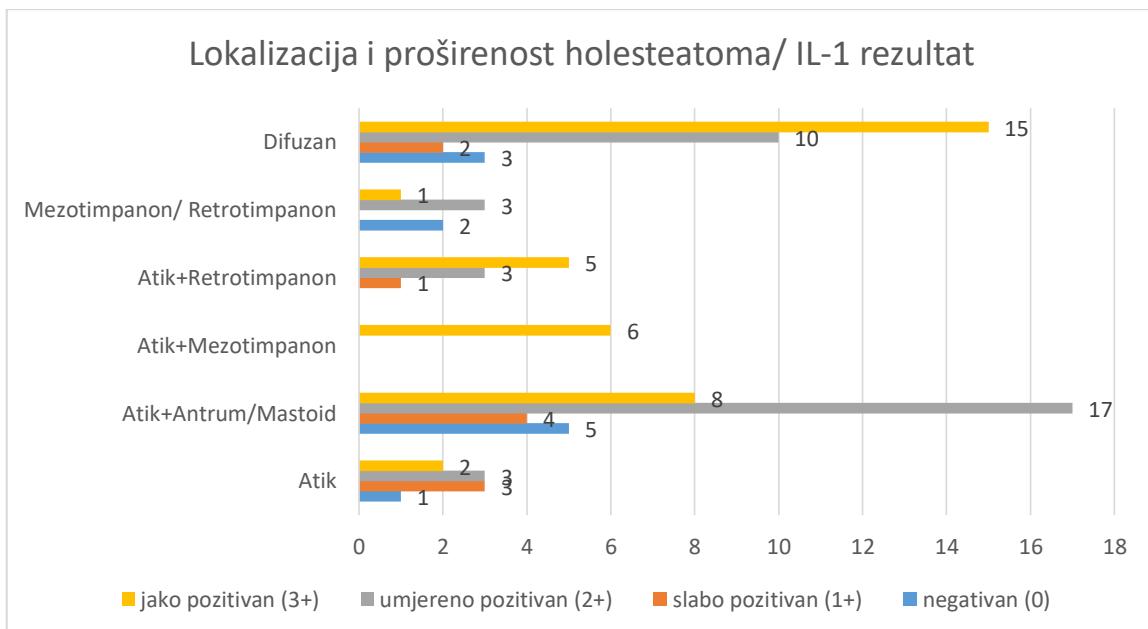
### 5.11.3.2. Ekspresija IL-1 i lokalizacija i proširenost holesteatoma

Rezultati  $\chi^2$  testa su pokazali da u eksperimentalnoj grupi postoji statistički značajna razlika ( $p<0,05$ ) određenih tipova lokalizacije i proširenosti holesteatoma u odnosu na rezultate ekspresije IL-1. Distribucija u tabeli i grafikonu pokazuje dominantnu zastupljenost jako pozitivne ekspresije IL-1 kod ispitanika s difuzno proširenim holesteatomom, a umjereno pozitivne kod holesteatoma lokalizovanog u području atika i antruma i/ili mastoidnog nastavka (Tabela 85, Slika 28).

**Tabela 85.** Ekspresija IL-1 prema lokalizaciji i proširenosti holesteatoma

Lokalizacija i proširenost holesteatoma	Rezultat ekspresije IL-1				Ukupno	
	Negativan (0)	Slabo pozitivan (1+)	Umjereno pozitivan (2+)	Jako pozitivan (3+)		
Atik	N %	1 9,1%	3 30,0%	3 8,3%	2 5,4%	9 9,6%
Atik+antrum/mastoid	N %	5 45,5%	4 40,0%	17 47,2%	8 21,6%	34 36,2%
Atik+mezotimpanon	N %	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	6 16,2%	6 6,4%
Atik+Retrotimpanon	N %	0 0,0%	1 10,0%	3 8,3%	5 13,5%	9 9,6%
Mezotimpanon/ Retrotimpanon	N %	2 18,2%	0 0,0%	3 8,3%	1 2,7%	6 6,4%
Difuzan	N %	3 27,3%	2 20,0%	10 27,8%	15 40,5%	30 31,9%
Ukupno	N %	11 100,0%	10 100,0%	36 100,0%	37 100,0%	94 100,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=25,34$ ,  $p=0,046$ ;  $p<0,05$



**Slika 28.** Ispitanici i ekspresija IL-1 prema lokalizaciji i proširenosti holesteatoma

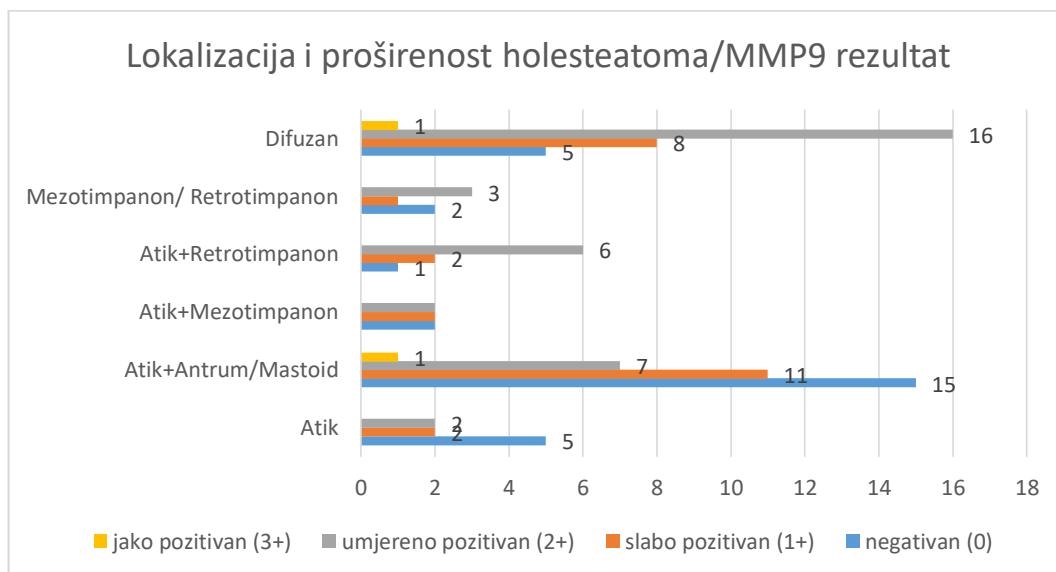
### 5.11.3.3. Ekspresija MMP-9 i lokalizacija i proširenost holesteatoma

Rezultati  $\chi^2$  testa nisu pokazali da u eksperimentalnoj grupi postoji statistički značajna razlika određenih tipova lokalizacije i proširenosti holesteatoma u odnosu na rezultate ekspresije MMP-9. Iako nije bila statistički značajna, distribucija na tabeli i slici pokazuje da je umjereno pozitivna ekspresija MMP-9 najviše bila zastupljena kod ispitanika s difuznim proširenim holesteatomom, dok je slabo pozitivna i negativna ekspresija bila najzastupljenija kod holesteatoma lokalizovanog u području atika i antruma i/ili mastoidnog nastavka (Tabela 86, Slika 29).

**Tabela 86. Ekspresija MMP-9 prema lokalizaciji i proširenosti holesteatoma**

Lokalizacija i proširenost holesteatoma	Rezultat ekspresije MMP-9				Ukupno	
	Negativan (0)	Slabo pozitivan (1+)	Umjereno pozitivan (2+)	Jako pozitivan (3+)		
Atik	N %	5 16,7%	2 7,7%	2 5,6%	0 0,0%	9 9,6%
Atik+antrum/mastoid	N %	15 50,0%	11 42,3%	7 19,4%	1 50,0%	34 36,2%
Atik+mezotimpanon	N %	2 6,7%	2 7,7%	2 5,6%	0 0,0%	6 6,4%
Atik+retrotimpanon	N %	1 3,3%	2 7,7%	6 16,7%	0 0,0%	9 9,6%
Mezo/Retrotimpanon	N %	2 6,7%	1 3,8%	3 8,3%	0 0,0%	6 6,4%
Difuzan	N %	5 16,7%	8 30,8%	16 44,4%	1 50,0%	30 31,9%
Ukupno	N %	30 100,0%	26 100,0%	36 100,0%	2 100,0%	94 100,0%

*Chi-square test:  $\chi^2=15,64, p=0,407$*



**Slika 29. Ekspresija MMP-9 prema lokalizaciji i proširenosti holesteatoma**

## 5.12. Medijatori inflamacije i rezultati mikrobiološkog ispitivanja

### 5.12.1. Mikrobiološki nalaz brisa uha na biogram i antibiogram

U ispitanom uzorku kod 99 (55,6%) ispitanika je utvrđen pozitivan mikrobiološki nalaz brisa uha na biogram i antibiogram. Statističkom analizom  $\chi^2$  razlike distribucije ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe prema mikrobiološkom nalazu brisa uha na biogram i antibiogram nije utvrđena statistička značajnost (Tabela 87).

**Tabela 87.** Ispitanici prema mikrobiološkom nalazu brisa uha na biogram i antibiogram

		Grupa		Ukupno	
		Eksperimentalna	Kontrolna		
Bris uha na biogram, antibiogram	Pozitivan	N	58	41	99
		%	59,8%	50,6%	55,6%
	Negativan	N	39	40	78
		%	40,2%	49,4%	44,4%
Ukupno		N	97	81	178
		%	100,0%	100,0%	100,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=2,55$ ,  $p=0,28$

### 5.12.1.1. Ekspresija TNF-R2 i mikrobiološki nalaz brisa uha na biogram i antibiogram

Prediktorski model je dokazao da stepen ekspresije TNF-R2 ima prediktivni uticaj na mikrobiološki nalaz brisa uha. Kod umjerenog pozitivnog ekspresije TNF-R2 se može očekivati najveća vjerovatnoća za pozitivan nalaz brisa uha na biogram i antibiogram ( $p<0,01$ ) (Tabela 88).

**Tabela 88.** Ekspresija TNF-R2 i mikrobiološki nalaz brisa uha na biogram i antibiogram

	Standardni koeficijenti		df	F	P
	Beta	S.E.			
Grupa	,053	,054	1	,969	,326
TNF-R2	-,174	,077	2	5,124	,007**

\*\* $p<0,01$ , TNF-R2 – receptor tumora nekroze alfa, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode F - test omjera varijanse

### **5.12.1.2. Ekspresija IL-1 i mikrobiološki nalaz brisa uha na biogram i antibiogram**

Prediktorski model nije dokazao statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji uticaja na mikrobiološki nalaz brisa uha na biogram i antibiogram (Tabela 89).

**Tabela 89. Ekspresija IL-1 i mikrobiološki nalaz brisa uha na biogram i antibiogram**

	Standardni koeficijenti		df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	,115	,067	1	2,926	,089
IL-1	-,118	,091	3	1,676	,174

*IL-1 - interleukin – 1, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. -standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; F - test omjera varijanse*

### **5.12.1.3. Ekspresija MMP-9 i mikrobiološki nalaz brisa uha na biogram i antibiogram**

Prediktorski model nije dokazao statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji uticaja na mikrobiološki nalaz brisa uha na biogram i antibiogram (Tabela 90).

**Tabela 90. Ekspresija MMP-9 i mikrobiološki nalaz brisa uha na biogram i antibiogram**

	Standardni koeficijenti		df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	,077	,062	1	1,566	,212
MMP-9	-,092	,095	3	,941	,422

*MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9, Beta - standardni koeficijent parcijalne regresije; S.E. - standardna greška regresije; df - broj stepeni slobode; F - test omjera varijanse*

### 5.12.2. Vrsta izolovanog bakteriološkog uzročnika

U ukupnom uzorku, kod 94 ispitanika su izolovane pojedine vrste bakterioloških uzročnika. Najveću učestalost je pokazao *Staphylococcus aureus*, koji je bio izolovan kod 41 (43,6%), a potom *Pseudomonas aeruginosa* kod 32 (34%) ispitanika. Rezultati  $\chi^2$  testa su pokazali da ne postoji statistički značajna razlika između eksperimentalne i kontrolne grupe prema vrsti izolovanog bakteriološkog uzročnika (Tabela 91).

**Tabela 91.** Ispitanici prema vrsti izolovanog bakteriološkog uzročnika

		Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Vrsta izolovanog bakteriološkog uzročnika	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N %	22 23,4%	10 10,6% 32 34,0%
	<i>Proteus mirabilis</i>	N %	10 10,6%	8 8,5% 18 19,1%
	<i>Staphylococcus aureus</i>	N %	24 25,5%	17 18,1% 41 43,6%
	<i>Escherichia coli</i>	N %	1 1,1%	0 0,0% 1 1,1%
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	N %	1 1,1%	0 0,0% 1 1,1%
	<i>Serratia Marcescens</i>	N %	0 0,0%	1 1,1% 1 1,1%
Ukupno		N %	58 61,7%	36 38,3% 94 100,0%

Chi-square test:  $\chi^2=3,98$ ,  $p=0,55$

### 5.12.2.1. Ekspresija TNF- R2, IL-1 i MMP-9 i vrsta izolovanog bakteriološkog uzročnika

Prediktorski model koji je obuhvatao kategorije ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9, u odnosu na inflamirano tkivo kavuma timpani i tkivo holesteatoma, nije utvrdio statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji uticaja na vrstu izolovanog bakteriološkog uzročnika.

## 5.13. Medijatori inflamacije i rezultati audiološkog ispitivanja

### 5.13.1. Preoperativni i postoperativni prosječni prag sluha i vazdušno-koštani gep

Primjenom *Mann-Whitney U* testa uočena je statistički značajna razlika ( $p<0,05$ ) između eksperimentalne i kontrolne grupe po pitanju preoperativnih (<3 mjeseca) vrijednosti ABG. Medijana za eksperimentalnu grupu je iznosila 31,43, a kontrolnu 27,61 što je ukazalo da je eksperimentalna grupa imala statistički značajno više vrijednosti od kontrolne. Razlika između obje grupe po pitanju vrijednosti postoperativnog (nakon šest mjeseci) ABG se takođe pokazala statistički značajnom ( $p<0,05$ ) gdje su vrijednosti medijane za eksperimentalnu grupu (26,84) bile statistički značajno više u odnosu na kontrolnu (21,76). Razlika u preoperativnim i postoperativnim vrijednostima PTA između obje grupe se nije pokazala statistički značajnom (Tabela 92).

**Tabela 92.** Ispitanici prema preoperativnim i postoperativnim vrijednostima prosječnog praga sluha i vazdušno-koštanog gega

	Grupa	N	M Rank	Mdn	SD	Mann- Whitney	p
Vrijednost preoperativnog PTA (dB)	Eksperimentalna	96	92,12	62,05	23,99	U=3588,50; Z=-,882	0,378
	Kontrolna	81	85,30	59,09	20,68		
	Ukupno	177					
Vrijednost postoperativnog PTA (dB)	Eksperimentalna	96	94,13	59,09	25,73	U=3395,50; Z=-1,451	0,147
	Kontrolna	81	82,92	53,73	25,11		
	Ukupno	177					
Vrijednost preoperativnog ABG (dB)	Eksperimentalna	96	95,88	31,43	14,56	U=3227,50; Z=1,946	0,050*
	Kontrolna	81	80,85	27,61	12,50		
	Ukupno	177					
Vrijednost postoperativnog ABG (dB)	Eksperimentalna	96	97,92	26,84	14,15	U=3031,50; Z=-2,523	0,012*
	Kontrolna	81	78,43	21,76	14,33		
	Ukupno	177					

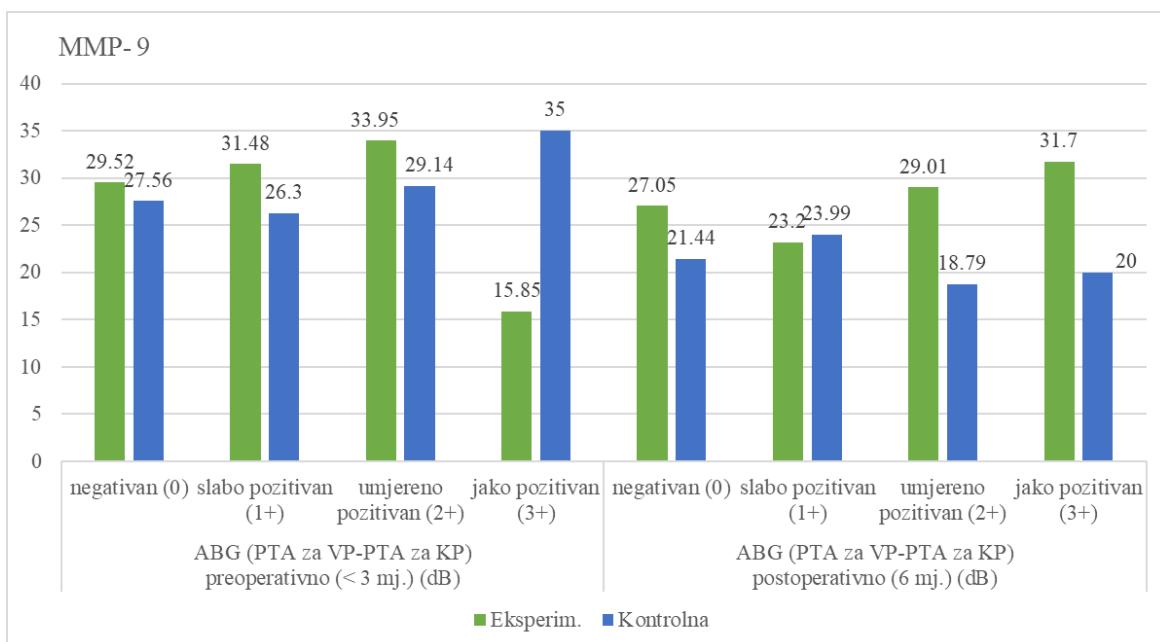
\* $p<0,05$ , PTA-pure tone average (prosječni prag sluha u decibelima - dB), ABG- air-bone gap (vazdušno-koštani gep u decibelima - dB), M Rank - vrijednost prosječnog ranga, Mdn - medijana, SD - standardna devijacija

### **5.13.1.1. Ekspresija TNF-R2 i IL-1 i MMP-9 i preoperativni/postoperativni prosječni prag slухa**

Primjenom ANOVA testa ponovljenih mjerjenja nije bilo statistički značajnog uticaja da li pripadnost eksperimentalnoj ili kontrolnoj grupi utiče na poboljšanje prosječnih vrijednosti PTA, kao ni statistički značajnog uticaja rezultata ekspresije TNF-R2, IL-1, MMP-9 na promjenu prosječne vrijednosti postoperativnog PTA.

### **5.13.1.2. Ekspresija TNF-R2 i IL-1 i MMP-9 i preoperativni/postoperativni vazdušno-koštani gep**

Po pitanju pojedinačnih varijabli, pripadnost eksperimentalnoj ili kontrolnoj grupi u odnosu na rezultate ekspresije MMP-9 je imala statistički značajan uticaj na prosječnu vrijednost postoperativnog ABG ( $p<0,01$ ). Srednje vrijednosti postoperativnog ABG u odnosu na preoperativni kod jako pozitivne ekspresije MMP-9 su bile značajno više u eksperimentalnoj grupi, za razliku od kontrolne gdje su bile značajno niže. Kod svih ostalih grupa ispitanika prosječne vrijednosti postoperativnog ABG su imale tendenciju pada (Slika 30). Nije dokazan statistički značajan uticaj rezultata ekspresije TNF-R2 i IL-1 na promjenu prosječne vrijednosti postoperativnog ABG.



**Slika 30. Ekspresija MMP-9 prema preoperativnim i postoperativnim vrijednostima vazdušno-koštanaog gega**

### 5.13.2. Udio ispitanika s postoperativnim prosječnim pragom sluha ispod 40 dB

Po pitanju postoperativnog poboljšanja sluha u ukupnom uzorku, kod 61 (34,3%) ispitanika vrijednost postoperativnog PTA je bila manja od 40 dB, a kod 117 (65,6%) takve promjene nisu zabilježene. Analizom  $\chi^2$  razlike distribucije između obje grupe po pitanju udjela ispitanika s postoperativnim ABG<40 dB, nije utvrđena statističku značajnost (Tabela 93).

**Tabela 93.** Udio ispitanika s postoperativnim prosječnim pragom sluha ispod 40 dB

		Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Vrijednost postoperativnog poboljšanja praga sluha; udio pacijenata s postoperativnim pragom sluha < 40 dB	Da	N	31	61
		%	32,0%	34,3%
	Ne	N	66	117
		%	68,0%	65,7%
Ukupno		N	97	178
		%	100,0%	100,0%

**Chi-square test:**  $\chi^2=0,505$ ,  $p=0,477$

Prediktorski model koji je obuhvatao ispitanike eksperimentalne i kontrolne grupe u odnosu na rezultate ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 nije dokazao statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji uticaja na postoperativno poboljšanje PTA<40 dB.

### 5.13.3. Postoperativno poboljšanje prosječnog praga sluha veće od 15 dB

Po pitanju postoperativnog poboljšanja sluha u ukupnom uzorku, 35 (19,7%) ispitanika je imalo poboljšanje PTA>15 dB, dok kod 143 (80,3%) takve promjene nisu zabilježene. Analizom  $\chi^2$  razlike distribucije između ispitanika obje grupe u odnosu na poboljšanje postoperativnog PTA>15 dB, nije utvrđena statistička značajnost (Tabela 94).

**Tabela 94.** Ispitanici prema postoperativnom prosječnom pragu sluha većem od 15 dB

		Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Vrijednost postoperativnog poboljšanja praga sluha (PTA>15 dB)	Da	N	18	35
		%	18,6%	21,0% 19,7%
	Ne	N	79	143
		%	81,4%	79,0% 80,3%
Ukupno		N	97	178
		%	100,0%	100,0% 100,0%

**Chi-square test:**  $\chi^2=0,165$ ,  $p=0,684$

Prediktorski model koji je obuhvatao ispitanike eksperimentalne i kontrolne grupe u odnosu na rezultate ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 nije dokazao statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji uticaja na postoperativno poboljšanje PTA>15dB.

#### **5.13.4. Postoperativno poboljšanje sluha s vazdušno-koštanim gepom ispod 20 dB**

Posmatrajući distribuciju ispitanika u ukupnom uzorku po pitanju postoperativnog poboljšanja sluha, 74 (41,5%) je imalo ABG<20 dB, dok kod 104 (58,4%) takve promjene nisu zabilježene. Razlika u distribuciji ispitanika po pitanju postoperativnog ABG<20 dB između obe grupe je bila statistički značajna ( $p<0,05$ ). U kontrolnoj grupi je zabilježena procentualno značajno veća zastupljenost ispitanika (51,9%) s poboljšanjem postoperativnog ABG<20dB, a u eksperimentalnoj značajno veća učestalost (67%) ispitanika kod kojih nisu uočene navedene promjene (Tabela 95).

**Tabela 95.** Ispitanici prema postoperativnom vazdušno-koštanom gepu ispod 20 dB

		Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
		N	32	
Vrijednost postoperativnog poboljšanja sluha, postoperativni vazdušno-koštani gep < 20 dB	da	N	32	42
	da	%	33,0%	51,9%
	ne	N	65	39
	ne	%	67,0%	48,1%
Ukupno		N	97	81
		%	100,0%	100,0%
				178

*Chi-square test:*  $\chi^2=6,465$ ,  $p=0,011$ ;  $p<0,05$

#### 5.13.4.1. Ekspresija TNF-R2 i postoperativni vazdušno-koštani gep ispod 20 dB

Model koji uključuje prediktore eksperimentalna/kontrolna grupa i rezultate TNF-R2 ekspresije nije bio statistički značajan za predikciju postoperativnog ABG<20 dB. Međutim, uvidom u učešće pojedinačnih varijabli u modelu, uočeno je da je prisustvo holesteatoma imalo statistički značajan ( $p<0,05$ ) uticaj na postoperativne vrijednosti ABG, a vjerovatnoća da će ispitanici s holesteatomom imati postoperativni ABG<20 dB je bila za 4,7 puta manja nego kod kontrolne grupe (Tabela 96).

**Tabela 96.** Ekspresija TNF-R2 i postoperativni vazdušno-koštani gep ispod 20 dB

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
Grupa: E/K(1)	-,756	,325	5,395	1	,020*	,470	,248	,889
TNF-R2			,283	3	,963			
TNF-R2(1): negativan (0)	-,128	,610	,044	1	,834	,880	,266	2,909
TNF-R2:slabo pozitivan (1+)	,137	,495	,077	1	,782	1,147	,435	3,025
TNF-R2: umjereno pozitivan (2+)	-,029	,445	,004	1	,948	,972	,406	2,324
Konstanta	,050	,449	,012	1	,911	1,051		

\* $p<0,05$ , TNF-R2 – receptor tumora nekroze alfa, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, TNF-R2, B-koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, d f- broj stepeni slobode, Exp (B) - eksponencija B koeficijenta, C.I. - interval povjerenja

#### 5.13.4.2. Ekspresija IL-1 i postoperativni vazdušno-koštani gep ispod 20 dB

Model koji uključuje prediktore ekperimentalna/kontrolna grupa i rezultate IL-1 ekspresije nije bio statistički značajan za predikciju postoperativnog poboljšanja sluha s ABG< 20 dB. Međutim, uvidom u učešće pojedinačnih varijabli u modelu, uočeno je da je prisustvo holesteatoma imalo statistički značajan uticaj ( $p<0,05$ ) po pitanju postoperativnih vrijednosti ABG, a vjerovatnoća da će ispitanici s holesteatomom imati postoperativni ABG<20 dB je za 4,5 puta bila manja nego kod kontrolne grupe (Tabela 97).

**Tabela 97.** Ekspresija IL-1 i postoperativni vazdušno-koštani gep ispod 20 dB

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
grupa: E/K(1)	-,800	,322	6,186	1	,013*	,449	,239	,844
IL1			1,379	3	,711			
IL1: negativan (0)	-,013	,666	,000	1	,985	,987	,268	3,639
IL1: slabo pozitivan (1+)	,088	,545	,026	1	,871	1,092	,375	3,182
IL1: umjeren pozitivan (2+)	,388	,346	1,257	1	,262	1,474	,748	2,902
Konstanta	-,066	,264	,063	1	,801	,936		

\*  $p<0,05$ ; IL-1 – interleukin-1, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, IL-1, a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, TNF-R2, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - broj stepeni slobode, Exp (B) - eksponencija B koeficijenta, C.I. - interval povjerenja

### 5.13.4.3. Ekspresija MMP-9 i postoperativni vazdušno-koštani gep ispod 20 dB

Model koji uključuje prediktore eksperimentalna/kontrolna grupa i rezultate MMP-9 ekspresije nije bio statistički značajan za predikciju postoperativnog poboljšanja sluha s ABG<20 dB. Međutim, uvidom u učešće pojedinačnih varijabli u modelu, uočeno je da je prisustvo holesteatoma imalo statistički značajan uticaj ( $p<0,05$ ) po pitanju postoperativnih vrijednosti ABG, a vjerovatnoća da će ispitanici s holesteatomom imati postoperativni ABG<20 dB je za 4,7 puta bila manja nego kod kontrolne grupe (Tabela 98).

**Tabela 98.** Ekspresija MMP-9 i postoperativni vazdušno-koštani gep ispod 20 dB

Prediktori u modelu <sup>a</sup>	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95% C.I. za EXP(B)	
							Donji	Gornji
grupa: E/K(1)	-,757	,318	5,683	1	,017**	,469	,252	,874
MMP-9			,249	3	,969			
MMP-9: negativan (0)	-,302	1,047	,083	1	,773	,739	,095	5,754
MMP-9: slabo pozitivan (1+)	-,268	1,056	,064	1	,800	,765	,096	6,064
MMP-9: umjereno pozitivan (2+)	-,422	1,063	,158	1	,691	,656	,082	5,261
Konstanta	,379	1,030	,135	1	,713	1,460		

\*  $p<0,05$ ; a. Varijable uključene u step 1: grupa: E/K, MMP-9, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - broj stepeni slobode, Exp (B) - eksponencija B koeficijenta, C.I. - interval povjerenja

### 5.13.5. Preoperativni stepen oštećenja sluha

Prema procentu preoperativnog stepena oštećenja sluha (< tri mjeseca) u ukupnom uzorku, najveću učestalost su pokazali ispitanici s umjerenim (23,2%) i srednje teškim (22%) stepenom. Iako je bila relativno niska ( $p=0,06$ ), razlika u distribuciji preoperativnog stepena oštećenja sluha između ispitanika obje grupe se nije pokazala statistički značajnom (Tabela 99). Prediktorski model koji je obuhvatao ispitanike eksperimentalne i kontrolne grupe i rezultate ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 nije dokazao statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji vrijednosti preoperativnog stepena oštećenja sluha.

**Tabela 99.** Ispitanici prema preoperativnom stepenu oštećenja sluha

Stepen oštećenja sluha (dB) - preoperativno (< tri mjeseca)	Grupa		Ukupno	
	Eksperimentalna	Kontrolna		
	N	2	1	3
Normalan (-10-15 dB)	N	2	1	3
	%	2,1%	1,2%	1,7%
Blago (16-25 dB)	N	6	3	9
	%	6,3%	3,7%	5,1%
Laki (26-40 dB)	N	9	18	27
	%	9,4%	22,2%	15,3%
Umjeren (41-55 dB)	N	26	15	41
	%	27,1%	18,5%	23,2%
Srednje težak (56-70 dB)	N	17	22	39
	%	17,7%	27,2%	22,0%
Težak (71-90 dB)	N	18	15	33
	%	18,8%	18,5%	18,6%
Duboki (>90 dB)	N	18	7	25
	%	18,8%	8,6%	14,1%
Ukupno	N	96	81	177
	%	100,0%	100,0%	100,0%

**Chi-square test:**  $\chi^2=11,85$ ,  $p=0,06$

### 5.13.6. Postoperativni stepen oštećenja sluha

Prema procentu postoperativnog stepena oštećenja sluha (nakon šest mjeseci) u ukupnom uzorku, najveću učestalost su pokazali ispitanici s lakisim stepenom (25,3%). Razlika u distribuciji postoperativnog stepena oštećenja sluha između ispitanika obje grupe se nije pokazala statistički značajnom (Tabela 100). Prediktorski model koji je obuhvatao ispitanike eksperimentalne i kontrolne grupe i rezultate ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 nije dokazao statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji vrijednosti postoperativnog stepena oštećenja sluha.

**Tabela 100.** Ispitanici prema postoperativnom stepenu oštećenja sluha

Stepen oštećenja sluha (dB) - postoperativno (šest mjeseci)	Grupa		Ukupno	
	Eksperimentalna	Kontrolna		
Normalan (-10-15 dB)	N	6	3	9
	%	6,2%	3,7%	5,1%
Blago (16-25 dB)	N	2	10	12
	%	2,1%	12,3%	6,7%
Laki (26-40 dB)	N	24	21	45
	%	24,7%	25,9%	25,3%
Umjeren (41-55 dB)	N	17	12	29
	%	17,5%	14,8%	16,3%
Srednje težak (56-70 dB)	N	19	14	33
	%	19,6%	17,3%	18,5%
Težak (71-90 dB)	N	15	14	29
	%	15,5%	17,3%	16,3%
Duboki (>90 dB)	N	14	7	21
	%	14,4%	8,6%	11,8%
Ukupno	N	97	81	178
	%	100,0%	100,0%	100,0%

**Chi-square test:**  $\chi^2=9,15$ ,  $p=0,16$

## 5.14. Medijatori inflamacije i kliničke karakteristike palatinalnih tonzila

### 5.14.1. Orofaringoskopski nalaz palatinalnih tonzila

Orofaringoskopskim pregledom ukupnog uzorka, kod 155 (87,1%) ispitanika je uočeno prisustvo palatinalnih tonzila, dok je 23 (12,9%) bilo tonzilektomirano. Primjenom  $\chi^2$  testa utvrđena je statistički značajna razlika ( $p<0,05$ ) u procentualnoj distribuciji ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe prema nalazu orofaringoskopije, gdje su tonzilektomirani ispitanici eksperimentalne grupe (17,5%) pokazali značajno veću učestalost u odnosu na ispitanike kontrolne (7,4%) (Tabela 101).

**Tabela 101.** Ispitanici prema orofaringoskopskom nalazu palatinalnih tonzila

		Grupa		Ukupno
		Eksperimentalna	Kontrolna	
Orofaringoskopski nalaz palatinalnih tonzila	Prisutne palatinalne tonzile	N	80	75
		%	82,5%	92,6%
	Tonzilektomiran/a	N	17	6
		%	17,5%	7,4%
Ukupno		N	97	81
		%	100,0%	100,0%
				178
				100,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=4,02$ ,  $p=0,045$ ;  $p<0,05$

#### 5.14.1.1. Ekspresija TNF-R2 i orofaringoskopski nalaz palatinalnih tonzila

Kategorijalna regresija koja je obuhvatala varijable "eksperimentalna/kontrolna grupa" i rezultate ekspresije TNF-R2, pokazala je da prisustvo holesteatoma ima statistički prediktivni uticaj na orofaringoskopski nalaz palatinalnih tonzila, pri čemu postoji veća vjerovatnoća da su ispitanici eksperimentalne grupe tonzilektomirani (Tabela 102).

**Tabela 102.** Ekspresija TNF-R2 i orofaringoskopski nalaz palatinalnih tonzila

	Standardni koeficijenti		df	F	P
	Beta	S.E.			
Grupa	,155	,066	1	5,511	,020*
TNF-R2	-,143	,110	2	1,697	,186

\* $p <0.05$ , TNF-R2 - receptor tumora nekroze alfa, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - broj stepeni slobode, F - test omjera varijanse

#### **5.14.1.2. Ekspresija IL-1 i orofaringoskopski nalaz palatinalnih tonzila**

Kategorijalna regresija koja je obuhvatala varijable "eksperimentalna/kontrolna grupa" i rezultate ekspresije IL-1, nije pokazala statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji uticaja na orofaringoskopski nalaz palatinalnih tonzila.

#### **5.14.1.3. Ekspresija MMP-9 i orofaringoskopski nalaz palatinalnih tonzila**

Kategorijalna regresija koja je obuhvatala varijable "eksperimentalna/kontrolna grupa" i rezultate ekspresije MMP-9 pokazala je da prisustvo holesteatoma ima statistički prediktivni uticaj na orofaringoskopski nalaz palatinalnih tonzila, pri čemu postoji veća vjerovatnoća da su ispitanici eksperimentalne grupe tonzilektomirani (Tabela 103).

**Tabela 103. Ekspresija MMP-9 i orofaringoskopski nalaz palatinalnih tonzila**

	Standardni koeficijenti		df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	,162	,071	1	5,216	,024*
MMP-9	-,081	,094	2	,737	,480

\* $p < 0,05$ , MMP-9 - matriks metaloproteinaza 9, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - broj stepeni slobode, F - test omjera varijanse

#### **5.14.2. Tip hroničnog tonsilitisa**

Po pitanju distribucije ispitanika prema tipu hroničnog tonsilitisa, zastupljenost ispitanika s atrofičnim (49,7%) i hipertrofičnim (50,3%) tipom je bio relativno izbalansiran. Ispitanici s atrofičnim (57,3%) tipom su bili najzastupljeniji u kontrolnoj grupi, a s hipertrofičnim (57,5%) u eksperimentalnoj grupi. Iako je bila relativno niska, razlika između obje grupe po pitanju tipa hroničnog tonsilitisa se nije pokazala statistički značajnom ( $p=0,06$ ) (Tabela 104).

**Tabela 104. Ispitanici prema tipu hroničnog tonsilitisa**

		Grupa		Ukupno	
		Eksperimentalna	Kontrolna		
Tip hroničnog tonsilitisa	Atrofični	N	34	77	
		%	42,5%	57,3% 49,7%	
	Hipertrofični	N	46	78	
		%	57,5%	42,7% 50,3%	
Ukupno		N	80	155	
		%	100,0%	100,0% 100,0%	

**Chi-square test:**  $\chi^2=3,41$ ,  $p=0,06$

#### **5.14.2.1. Ekspresija TNF-R2 i MMP-9 i tip hroničnog tonsilitisa**

Kategorijalna regresija, koja je obuhvatala varijable "eksperimentalna/kontrolna grupa" i rezultate ekspresije TNF-R2 i MMP-9 ekspresije, nije pokazala statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji uticaja na tip hroničnog tonsilitisa.

#### **5.14.2.2. Ekspresija IL-1 i tip hroničnog tonsilitisa**

Kategorijalna regresija koja je obuhvatala varijable "eksperimentalna/kontrolna grupa" i rezultate ekspresije IL-1, pokazala je da prisutvo holesteatoma ima statistički prediktivni uticaj na vjerovatnoću da će ispitanici imati hipertrofični tip hroničnog tonsilitisa (Tabela 105).

**Tabela 105. Ekspresija IL-1 i tip hroničnog tonsilitisa**

	Standardni koeficijenti		df	F	P
	Beta	S.E.			
Grupa	,176	,081	1	4,767	,031*
IL-1	,113	,127	2	,787	,457

\* $p<0,05$ , IL-1 - interleukin – 1, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - broj stepeni slobode, F - test omjera varijanse

#### **5.14.3. Veličina palatinalnih tonsila**

Od 155 (87%) ispitanika s prisutnim palatinalnim tonsilama, najveću učestalost su pokazale palatinalne tonsile unutar tonsilarne jame – gradus 0 (48,4%) i s opstrukcijom isthmus faucium-a < ,=25% – gradus 2 (27,1%). Statističkom analizom razlike broja ispitanika prema gradusima veličine palatinalnih tonsila nije utvrđena statistička značajnost (Tabela 106).

**Tabela 106. Ispitanici prema veličini palatinalnih tonsila**

		Grupa		Ukupno
		eksperimentalna	kontrolna	
	Gradus 0: palatinalne tonsile unutar tonsilarne jame	N	33	42
		%	41,3%	56,0%
				48,4%
Klinička procjena veličine palatinalnih tonsila	Gradus 1: palatinalne tonsile opstruišu < ,=25% isthmus-a	N	15	10
		%	18,8%	13,3%
				16,1%
	Gradus 2: palatinalne tonsile opstruišu 26 do <50% isthmus-a	N	24	18
		%	30,0%	24,0%
				27,1%
	Gradus 3: palatinalne tonsile opstruišu 51 do <75% isthmus-a	N	8	5
		%	10,0%	6,7%
				8,4%
Ukupno		N	80	75
		%	100,0%	100,0%
				100,0%

*Chi-square test:*  $\chi^2=3,47$ ,  $p=0,34$

Ordinalna regresija, koja je obuhvatala varijable "eksperimentalna/kontrolna grupa" i rezultate ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9, nije pokazala statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji uticaja na veličinu palatinalnih tonzila.

## 6. DISKUSIJA

Razlika u aritmetičkim sredinama prosječne starosne dobi ispitanika, koja je za eksperimentalnu grupu iznosila 49, a kontrolnu 54 godine, pokazala se kao statistički značajna. Distribucija ispitanika prema starosnim grupama je takođe pokazala statistički značajnu razliku, gdje su u eksperimentalnoj ispitanici starosne dobi do 16 godina pokazali statistički značajno veću učestalost. Tokom svoje šesnaestogodišnje studije operativno tretiranih holesteatoma, *Toš* dokazuje godišnju incidencu od tri holesteatoma u dječjoj i 12,6 u odrasloj dobi na 100.000 stanovnika [18]. *Yousuf* i saradnici u kliničkoj studiji hronične upale srednjeg uha i holesteatoma ističu da je najveća incidenca stečenog holesteatoma u starosnoj grupi od 11-20 godina (54%) za kojom po učestalosti slijedi grupa od 0-10 godina (20%) [191]. *Harker* i saradnici u svom istraživanju pronalaze godišnju incidencu od šest holesteatoma na 100.000 stanovnika s najvećom učestalošću u drugoj i trećoj dekadi života, dok *Nelson* i saradnici ističu da prosječna starosna dob djece s kongenitalnim holesteatomom iznosi 5,6+-2,8, a sa stečenim 9,7+-3,3 godine [14, 192].

Prosječna životna dob ispitanika u eksperimentalnoj grupi prema stepenu ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 je bila statistički značajno niža u odnosu na kontrolnu, a prisustvo holesteatoma je imalo statistički značajnu predikciju za pripadnost mlađoj starosnoj dobi. Slabo pozitivna ekspresija TNF-R2 je bila statistički značajan prediktor za pripadnost starijoj životnoj dobi u odnosu na jako pozitivnu ekspresiju. Nije dokazana statistički značajna povezanost nivoa ekspresije IL-1 i MMP-9 s pojedinim starosnim grupama. *Yetiser* i saradnici u studiji ispitivanja ekspresije TNF-alfa, IL-1 alfa i EGF kod hronične upale srednjeg uha sa i bez holesteatoma ne pronalaze statistički značajnu povezanost ekspresije ispitivanih biomarkera sa starosnom dobi ispitanika, koja se kretala od 18 do 52 godine. Postoji izvjesno ograničenje po pitanju ispitivanog kliničkog faktora jer u navedeno istraživanje nisu bili uključeni ispitanici mlađe starosne dobi ispod 18 godina [109]. *Sastray* i saradnici, ispitujući ulogu TNF- $\alpha$  u koštanoj destrukciji kod holesteatoma srednjeg uha, ne pronalaze statističku značajnu povezanost stepena ekspresije TNF- $\alpha$  sa starosnom dobi pacijenata [193]. Međutim, *Dornelles* i saradnici pronalaze značajno veću mikromilimetarsku debljinu perimatriksa holesteatoma kod ispitanika mlađe dobi (ispod 18 godina) s dominatnim prisustvom inflamatornih ćelija i aktivnoj ulozi citokina u odnosu na

fibrozno tkivo, koje je bilo više zastupljeno kod odraslih. Autori ističu da postoji blaga do umjerena inverzna korelacija stepena inflamacije s uzrastom pacijenata u vrijeme operativnog zahvata [52].

Prema polnoj strukturi, u eksperimentalnoj grupi su najzastupljeniji bili ispitanici muškog pola od kojih je 27 (65,9%) imalo umjerenu, a 19 (70,4%) jako pozitivnu ekspresiju TNF-R2, dok su u kontrolnoj bili zastupljeniji ispitanici ženskog pola, od kojih je 23 (59%) imalo umjerenu, a 23 (59%) slabo pozitivnu ekspresiju TNF-R2. Ispitanici muškog pola su takođe pokazali najveću zastupljenost u eksperimentalnoj grupi po pitanju stepena ekspresije IL-1, od kojih je 26 (72,2%) imalo umjerenu, a 24 (63,2%) jako pozitivnu ekspresiju. U kontrolnoj grupi su zastupljeniji bili ispitanici ženskog pola, od kojih je 26 (33,3%) s jako pozitivnom ekspresijom IL-1 pokazalo najveću učestalost. Prema polnoj strukturi, u eksperimentalnoj grupi su najzastupljeniji bili ispitanici muškog pola s umjereno pozitivnom (75,0%) i slabo pozitivnom (66,7%) ekspresijom MMP-9, dok su u kontrolnoj bili zastupljeniji ispitanici ženskog pola s negativnom (53,8%) i slabo pozitivnom (69,2%) ekspresijom MMP-9.

U eksperimentalnoj grupi su statistički značajno bili zastupljeni ispitanici muškog pola što je u skladu s podacima iz literature. *Aquino* i saradnici, u epidemiološkoj studiji ukupnog uzorka od 1146 ispitanika mlađe i starije životne dobi, utvrđuju dominantno prisustvo holesteatoma kod 67,4% ispitanika muškog u odnosu na 35,3% ženskog pola, dok *Nelson* i saradnici dokazuju da je incidenca holesteatoma kod muškog za 4,1 puta veća u odnosu na ženski pol [192, 194]. Umjerena i jako pozitivna ekspresija TNF-R2, IL-1 i MMP-9 je bila najučestalija u eksperimentalnoj grupi kod ispitanika muškog, a u kontrolnoj kod ženskog pola. Prisustvo holesteatoma je imalo statistički značajnu predikciju za pripadnost muškom polu. Negativna ekspresija TNF-R2 je imala negativan statistički prediktivni uticaj na pripadnost muškom polu u odnosu na jako pozitivnu ekspresiju.

Nije dokazan statistički značajan uticaj stepena ekspresije IL-1 i MMP-9 u odnosu na polnu strukturu ispitanika. *Yetiser* i saradnici, sprovodeći ispitivanje ekspresije TNF-alfa, IL-1 alfa i EGF kod hronične upale srednjeg uha sa i bez holesteatoma, nisu pronašli statistički značajnu razliku između nivoa ekspresije ispitivanih biomarkera u odnosu na polnu strukturu [109]. *Lee* i saradnici u svom istraživanju dokazuju visoke, ali ne i statistički značajne nivoje ekspresije receptora molekularnih uzoraka (eng. *TLRs - Toll-like receptors*), IL-6 i TNF- $\alpha$  u tkivu holesteatoma kod ispitanika ženskog pola [195]. Pregledom dostupne literature i pretraživanjem naučnih baza podataka nisu pronađena objavljena istraživanja o povezanosti stepena ekspresije MMP-9 u odnosu na polnu strukturu ispitanika.

Ispitujući simptomatologiju hronične upale srednjeg uha, razlika dobijena analizom distribucije ispitanika obje grupe u odnosu na prisustvo simptoma otalgije, sekrecije iz uha, oslabljenog sluha i tinitusa nije bila od statističkog značaja za razliku od simptoma vrtoglavice i glavobolje gdje je takav nivo značajnosti utvrđen. U odnosu na prisustvo simptoma hronične upale srednjeg uha, u obje grupe su zabilježeni rezultati visokopozitivne ekspresije TNF-R2 i IL-1. Kod ispitanika eksperimentalne grupe, rezultati ekspresije MMP-9 su bili takođe visokopozitivni za razliku od kontrolne gdje nije zabilježen takav slučaj. Prediktorski model nije dokazao statistički značajnu povezanost stepena ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 s prisustvom navedenih simptoma hronične upale srednjeg uha, dok je prisustvo holesteatoma imalo statistički značajan prediktivni uticaj na pojavu simptoma vrtoglavice i glavobolje. *Sade* i saradnici u studiji holesteatoma i mastoidne hirurgije navode sekreciju iz uha kao prvi simptom u 62% i prisustvo oslabljenog sluha u 11% slučajeva, dok *Aquino* i saradnici, sprovodeći epidemiološko istraživanje holesteatoma srednjeg uha i mastoida, navode sekreciju iz uha (66,5%) praćenu udruženim simptomima sekrecije iz uha, oslabljenog sluha i tinitusa (23,3%) i oslabljenim sluhom (7,6%) [194, 196]. *Wy* i saradnici, ispitujući stepen ekspresije MMP-2, MMP-9 i IL-6 u odnosu na starosnu dob, polnu pripadnost i prisustvo simptoma glavobolje, vrtoglavice, paralize facijalnog nerva i slušne oštećenosti kod ispitanika sa i bez holesteatoma srednjeg uha, nisu dokazali statistički značajnu razliku [197]. Postoje značajni dokazi koji pokazuju da su određeni citokini uključeni ne samo u iniciranje, već i u perzistiranje patološkog bola, direktnom aktivacijom nociceptivnih senzornih neurona. Određeni upalni citokini imaju ulogu u centralnom nervnom sistemu kod traumatski uzrokovanih upalnih procesa i povezani su s razvojem kontralateralne hiperalgezije i alodinije [198].

Prosječna vrijednost vremenskog intervala od pojave prvih simptoma bolesti do postavljanja dijagnoze iznosio je aproksimativno 12 godina. U obje grupe su bili najviše zastupljeni ispitanici s visokopozitivnom ekspresijom TNF-R2 i IL-1 za razliku od negativnog stepena ekspresije MMP-9, koji je pokazao najveću učestalost. Nije utvrđena statistički značajna povezanost stepena ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 s ispitivanim vremenskim intervalom. *Aquino* i saradnici su istražili da se vremenski interval od pojave prvih simptoma do prvog javljanja doktoru kod 30% ispitanika sa holesteatomom srednjeg uha kretao od 6-15 godina, iako se 50% simptoma već manifestovalo prije 15. godine života. Autori takođe navode da su razlozi kasnog javljanja najčešće bili socijalne i ekonomske prirode, nedostupnost otorinolaringološima i da ispitanici nisu pridavali značaj pojavi otoloških simptoma osim bola, vrtoglavice i krvarenja [194]. *Skotnicka* i saradnici,

istražujući značaj pojednih citokina kod hroničnog otitisa, nisu pronašli statistički značajnu korelaciju koncentracije TNF- $\alpha$ , IL-1, -8, -10 s uzrastom, trajanjem gubitka sluha i broja epizoda akutne upale srednjeg uha [199]. Istraživanja su dokazala da visoka ekspresija TNF- $\alpha$  predstavlja značajan rizik za naknadne epizode, duži tok i hronicitet upalnog procesa srednjeg uha [200-202].

*Palva* i saradnici navode da prosječno vrijeme trajanja simptoma kod holesteatoma u dječjem uzrastu iznosi 5,8 godina, dok *Belachdi* i saradnici utvrđuju povezanost veće stope recidiva holesteatoma u dječjem uzrastu sa trajanjem simptoma duže od dvije godine [203, 204]. *Djurhuus* i saradnici ističu značaj insercije aeracionih cjevčica u srednje uho kod dječije populacije, kao potencijalnog faktora koji doprinosi smanjenju stope incidence holesteatoma srednjeg uha [205]. *Vitale* i saradnici navode da razlika u nivoima TNF- $\alpha$  može biti povezana s različitim faktorima, kao što su trajanje bolesti, intenzitet lokalne infekcije ili prisutnost i raspodjela TNF- $\alpha$  receptora u matriksu holesteatoma. Međutim, detaljnija analiza ove hipoteze je limitirana zbog nedovoljnog broja publikovanih radova [80].

Prosječna vrijednost vremenskog intervala od postavljanja dijagnoze do prijema u kliniku zbog hirurškog liječenja iznosila je aproksimativno 9 mjeseci. U obje grupe su bili najviše zastupljeni ispitanici s visokopozitivnom ekspresijom TNF-R2 i IL-1. Visokopozitivna ekspresija MMP-9 je takođe pokazala najveću učestalost u eksperimentalnoj, a negativna u kontrolnoj grupi. Iako su zabilježene visoke vrijednosti ekspresije ispitivanih biomarkera, prediktorski model nije dokazao statistički značajnu povezanost stepena ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 i prisustva holesteatoma s ispitivanim vremenskim intervalom. Baze podataka pokazuju da rane tinejdžerske godine čine starosni pik za hiruršku intervenciju kod holesteatoma srednjeg uha, ali da postoji široka distribucija nekih pacijenata koji su operisani u sedmoj i osmoj dekadi života [19]. *Djurhuus* i saradnici, ispitujući incidencu hirurški liječenog holesteatoma srednjeg uha kod dječije populacije u periodu od 1977. do 2010. godine, dokazuju značajno smanjenje stope incidence inicijalno operisanog holesteatoma tokom posljednjih devet godina navedenog perioda, čemu je prethodio značajan porast incidence insercije aeracionih cjevčica u srednje uho [205]. *Morales* i saradnici dokazuju visoku ekspresiju MMP-2 kod invazivnih formi holesteatoma koji uzrokuju komplikacije u odnosu na neinvazivne i latentne forme, što u značajnoj mjeri može uticati na vremenski interval od postavljanja dijagnoze do hirurškog liječenja [206]. *Marella* i saradnici su istraživali povezanost procijenjene dužine bolesti s profilom citokina u tkivu holesteatoma. Analiza varijanse u jednom smjeru je pokazala značajnu povezanost između dužine bolesti i pozitivnosti individualne epitelne ćelije holesteatoma. Obrazac

bojenja na individualnom ćelijskom ili ukupnom nivou, kao nijedan intraoperativni nalaz (erozija kosti ili slušnih koščica, granulaciono tkivo) nisu značajno korelirali s procijenjenom dužinom bolesti [110].

Ispitujući istoriju hronične upale srednjeg uha, nije utvrđena statistički značajna razlika između dvije grupe. S pozitivnom istorijom hronične upale srednjeg uha u obje grupe su najviše bili zastupljeni ispitanici koji su imali visokopozitivnu ekspresiju TNF-R2 i IL-1, dok su najveću učestalost u odnosu na ekspresiju MMP-9, pokazali ispitanici s negativnim rezultatom. *Jennings* i saradnici, istražujući genetiku holesteatoma, navode da njegov nastanak može biti zavisan od kombinacije genetskih i faktora okoline, promjenljive ekspresije, dok *Takeuchi* i saradnici ističu značaj urođenog imunskog sistema u patofiziologiji holesteatoma, zahvaljujući ulozi receptora za prepoznavanje paterna (eng. *PRRs - Pattern recognition receptors*) u upalnom odgovoru [207, 208]. *Prinsley*, analizirajući evidenciju sindromskih slučajeva, ističe da geni koji kontrolišu morfologiju uha mogu biti faktori rizika za nastanak kongenitalnih ili stečenih holesteatoma [19]. U prvom sistemskom pregledu naučnih baza, vezanih za genetiku holesteatoma, *Jennings* i saradnici zaključuju da je nedovoljan broj naučne i stručne literature koja pruža dokaze o nasljednoj komponenti u njegovoј etiologiji [207].

U odnosu na istoriju operativnih zahvata hronične upale srednjeg uha, dokazana je statistički značajna razlika između ispitanika obje grupe, gdje su u kontrolnoj dominantno bili zastupljeni ispitanici koji nisu operativno tretirani. Ispitanici s visokopozitivnom ekspresijom TNF-R2 i IL-1 su pokazali najveću učestalost u obje grupe. Visokopozitivna ekspresija MMP-9 je bila najzastupljenija u eksperimentalnoj grupi, a negativna u kontrolnoj. Prisustvo holesteatoma je imalo pozitivan i statistički značajan prediktivni uticaj na pozitivnu istoriju operativnih zahvata hronične upale srednjeg uha, dok po istom pitanju nije dokazana statistički značajna povezanost s nivoima ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9. *Lee* i saradnici su dokazali visoku ekspresiju većine TLRs, receptora sličnih *NOD*-u (eng. *NLRs - NOD-like receptors*) i citokinske informacione RNA (eng. *mRNA - Messenger RNA*) u tkivu holesteatoma ispitanika, višestruko operisanih u odnosu na jednom operisane ispitanike. Navedeni receptori imaju ključnu ulogu u indukciji ekspresije medijatora inflamacije. Autori su takođe pronašli značajno više nivo TLR-8, NOD-2, IL-12 i TNF- $\alpha$  mRNAs kod reoperisanih u odnosu na ispitanike s inicijalnom hirurgijom holesteatoma [195]. *Kuczkowski* i saradnici, ispitujući ekspresiju TNF- $\alpha$ , IL-1  $\alpha$ , IL-6, -10 kod hronične upale srednjeg uha s osteolizom kosti, dokazuju da povišena aktivnost proinflamatornih citokina kod ispitanika s hroničnom upalom srednjeg uha i holesteatomom može ukazivati

na neophodnost hirurgije "otvorene tehnike" i "second look" operacije nakon nekoliko mjeseci [209].

U odnosu na istoriju unilateralnih ili bilateralnih operativnih zahvata hronične upale srednjeg uha nije dokazana statistički značajna razlika između ispitanika obje grupe u kojima su najviše bili zastupljeni ispitanici s visokopozitivnom ekspresijom TNF-R2 i IL-1. Po pitanju rezultata ekspresije MMP-9, najučestaliji u eksperimentalnoj grupi su bili ispitanici s negativnom i visokopozitivnom, a u kontrolnoj s negativnom ekspresijom. Visokopozitivna ekspresija TNF-R2, IL-1 i MMP-9 je imala statistički značajnu predikciju pozitivne istorije prethodnih operativnih zahvata na jednom ili oba uha, dok prisustvo holesteatoma nije imalo pozitivan i statistički značajan prediktivni uticaj na ispitivanu pojavu. *Dornelles* i saradnici pronalaze u epidemiološkoj studiji hronične upale srednjeg uha kod 450 pedijatrijskih ispitanika učestalost holesteatoma od 30%, čije je prisustvo u 12% slučajeva utvrđeno u oba srednja uha, dok *Deguine* i saradnici pronalaze uredan nalaz na kontralateralnoj membrani timpani samo u trećini slučajeva i prisutvo holesteatoma u kontralateralnom uhu u 10% slučajeva [210, 211]. Pregledom dostupne naučne literature i naučnih baza nisu pronađena istraživanja koja su proučavala ulogu i značaj ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 u odnosu na istoriju lateralnosti operativnih zahvata srednjeg uha.

Rezultati ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 nisu imali statistički značajnu predikciju nastanka ekstrakranijalnih i intrakranijalnih otogenih komplikacija kod ispitanika obje grupe. U eksperimentalnoj grupi su bili zastupljeniji ispitanici s visokopozitivnom ekspresijom sva tri ispitivana biomarkera. *Penido* i saradnici ističu da su intrakranijalne i ekstrakranijalne otogene komplikacije kod dječje populacije u razvijenim zemljama danas relativno rijetka pojava. Autori navode da je većina intrakranijalnih komplikacija (95,8%) uzrokovana holesteatomom srednjeg uha s najvećom incidencijom nastanka tokom prve tri decenije života i predominacijom kod muškog pola [212]. *Bernal Sprekelsen* i saradnici ističu da metaloproteinaze i osnovni faktor rasta fibroblasta (eng. *bFGF - basic fibroblast growth factor*) mogu objasniti destruktivne i proliferativne aktivnosti holesteatoma, dok *Morales* i saradnici dokazuju visokopozitivnu ekspresiju MMP-2 kod invazivnih formi holesteatoma koji uzrokuju komplikacije u odnosu na neinvazivne i latentne forme [206, 213].

Visoki procenat od 96,6% ispitanika u ukupnom uzorku je koristio antibiotsku terapiju, dok su najčešće korišteni antibiotici bili iz reda hinolona (44,5%) i cefalosporina (34,1%). Ispitanici eksperimentalne grupe su u značajno većem procentu (62,4%) koristili antibiotsku terapiju duži vremenski period, između 8-14 dana. Najveću učestalost u obje

grupe su pokazali ispitanici s visokopozitivnom ekspresijom TNF-R2, IL-1 i MMP-9, koji su koristili antibiotsku terapiju. Prisustvo holesteatoma je imalo statistički prediktivni uticaj na duži vremenski period upotrebe antibiotske terapije u trajanju od 8-14 dana. Visokopozitivna ekspresija TNF-R2, IL-1 i MMP-9 je imala statistički značajnu predikciju upotrebe antibiotika iz reda hinolona.

*Orihara* i saradnici navode da nivoi ekspresije TLR2 receptora mogu biti korisni prediktori u monitoringu stanja bakterijske infekcije, što pruža dodatne informacije u planiranju antibiotske terapije [214]. *Yetiser* i saradnici nisu dokazali statistički značajnu povezanost stepena ekspresije TNF- $\alpha$ , IL-1  $\alpha$  i EGFR i antibiotske terapije. Autori ističu da antibiotska terapija ne utiče značajno na nivo ekspresije ispitivanih citokina kod ispitanika s hroničnom upalom srednjeg uha i holesteatomom iako su dokazali da je u nekim slučajevima došlo do regresije upalnih i simptoma sekrecije iz uha [209]. *Barzilai* i saradnici, ispitujući dinamiku produkcije IL-1 u sekretu tokom upalnog procesa srednjeg uha, pronalaze značajno više nivoa IL-1 kod bakteriološki pozitivnih kultura u odnosu na negativne. Autori ističu da su se nivoi IL-1 značajno smanjili nakon 4-5 dana upotrebe antibiotske terapije bez obzira na to da li je došlo do eradikacije bakteriološkog uzročnika ili ne, što je bilo u suprotnosti s izmjerenim nivoima TNF- $\alpha$ , usko povezanim s prisustvom bakterija [215, 216].

Kada je ispitivano prisustvo perforacije membrane timpani, nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitanika obje grupe, gdje su najveću učestalost pokazali ispitanici s prisustvom perforacije membrane timpani i visokopozitivnom ekspresijom TNF-R2 i IL-1. Sličan rezultat je dobijen i po pitanju ekspresije MMP-9 za eksperimentalnu grupu. U odnosu na tip perforacije, uočena je statistički značajna razlika, gdje je kod ispitanika eksperimentalne grupe najveću učestalost pokazao ivični, a kod ispitanika kontrolne centralni tip perforacije membrane timpani. U obje grupe su najzastupljeniji bili ispitanici s visokopozitivnom ekspresijom TNF-R2 i IL-1. Ekspresija MMP-9 za eksperimentalnu grupu je imala relativno izbalansiran rezultat ( $R=0,+1,+2$ ), a kontrolnu negativan ( $R=0$ ). Prediktorski model je dokazao da je holesteatom statistički značajan prediktor prisustva ivične perforacije membrane timpani. Takođe je dokazano da visokopozitivna ekspresija IL-1 i MMP-9 čini statistički značajan prediktor prisustva ivičnog tipa, a negativna ekspresija MMP-9 centralnog tipa perforacije membrane timpani.

Po pitanju podtipa perforacije membrane timpani, uočena je razlika na nivou statističke značajnosti. Kod ispitanika eksperimentalne grupe najveću učestalost je pokazao atik podtip perforacije membrane timpani, a kod ispitanika kontrolne zadnji-ivični i subtotalni defekt. U obje grupe su najviše bili zastupljeni ispitanici s visokopozitivnom

ekspresijom TNF-R2 i IL-1. Ekspresija MMP-9 za eksperimentalnu grupu je pokazala negativan rezultat, a kontrolnu slabo pozitivan. Prisustvo holesteatoma srednjeg uha i visokopozitivna ekspresija IL-1 su se pokazali statistički značajnim prediktorima prisustva atik i zadnjeg-ivičnog podtipa, a negativna i slabo pozitivna ekspresija MMP-9 atik podtipa perforacije membrane timpani.

*Aquino* i saradnici, sprovodeći epidemiološku studiju holesteatoma srednjeg uha i mastoidnog nastavka, pronalaze prisustvo centralne perforacije membrane timpani u niskom procentu od 13% u njihovom uzorku, a ivičnog tipa i atik podtipa u visokom procentu od 73,6%. Autori ističu da je prisustvo holesteatoma uočeno na svim lokalizacijama, ali s najvećom učestalošću u području atika [194]. *Skotnicka* i saradnici, u studiji ispitivanja stepena ekspresije TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-8 i IL-10 kod hroničnog sekretornog otitisa u dječjem uzrastu, ne pronalaze statistički značajnu povezanost između patoloških promjena na membrani timpani i nivoa ispitivanih biomarkera [199]. *Wilmoth* i saradnici dokazuju visoku ekspresiju MMP na membrani timpani, stimulisanu od TNF-alfa i bakterijskog toksina LPS. Autori ističu da upalne promjene na membrani timpani uzrokuju oslobođanje enzima sposobnih za degradaciju ekstracelularnog matriksa što dovodi do nepovratnih patoloških promjena i razvoja holesteatoma [217]. *Spandow* i saradnici navode da faktori rasta imaju esencijalnu ulogu u procesu zarastanja perforacije membrane timpani koje može biti zaustavljeno uslijed nedostatka proteina ekstracelularnog matriksa [218]. *Santa Maria* i saradnici su takođe dokazali da geni poput faktora rasta (npr. članovi porodice EGF), njihovi receptori, citokini (npr. IL-19, IL-24) i različiti enzimi (npr. hijaluron sintaza 2) učestvuju u zarastanju perforacije membrane timpani. Rezultati ove studije pružaju polaznu osnovu za identifikaciju "molekularnih potpisa" i biomarkera povezanih sa bolešću i razvoj novih tretmana kod patoloških stanja na membrani timpani, zasnovanih na molekularnim dokazima [219].

Razlika u distribuciji ispitanih, prema prisustvu retrakcije membrane timpani, se nije pokazala kao statistički značajna iako je pokazala nisku vrijednost ( $p=0,070$ ). U obje grupe su bili najzastupljeniji ispitani bez prisustva retrakcije membrane timpani i visokopozitivnom ekspresijom TNF-R2 i IL-1. Sličan rezultat je dobijen i po pitanju ekspresije MMP-9 za eksperimentalnu grupu. *Welkoborsky* i saradnici ističu da bakterije unutar retrakcionog džepa produkuju pojedine antigene koji aktiviraju različite citokine i litičke enzime kao što su ICAM, RANKL, IL-1, -2, -6, MMP-2, -9, koji dovode do aktivacije i sazrijevanja osteoklasta s konsekvencom degradacije ekstracelularnog matriksa i hiperproliferacije, koštane erozije i finalno progresije bolesti [70]. *Wilmoth* i saradnici ističu

da bakterijski endotoksini indukuju ekspresiju TNF- $\alpha$ , a potom i MMPs u membrani timpani što rezultira oslobođanjem enzima sposobnih za razgradnju ekstracelularnog matriksa i nastankom irreverzibilnih patoloških promjena kao što su retrakcija i atelektaza membrane timpani i nastanak holesteatoma [217]. *Urik* i saradnici su u imunohistohemijskoj studiji dokazali pozitivnu ekspresiju MMP-9 u svim stadijumima retrakcionog džepa membrane timpani što ukazuje na degenerativni proces u ekstracelularnom matriksu vezivnog tkiva. Rezultati istraživanja idu u prilog teoriji retrakcionog džepa u nastanku holesteatoma [220]. *Sugita* i saradnici ističu da bakterijski endotoksini i citokini domaćina imaju sličan destruktivni učinak na epitelnim slojem membrane timpani. Učinci bakterijskog endotoksina mogu biti posredovani imunskim odgovorom domaćina [221]. Matriks metaloproteinaze i TNF- $\alpha$  su prethodno povezani s različitim hroničnim upalnim procesima, posebno onim koji uključuju gubitak fibrozne strome [222, 223].

Od ukupnog broja ispitanika s osteodestrukcijom zidova spoljašnjeg slušnog kanala i kavuma timpani najveću učestalost u obje grupe su pokazali ispitanici s visokopozitivnom ekspresijom TNF-R2. Po pitanju ekspresije IL-1, u eksperimentalnoj grupi su najzastupljeniji bili ispitanici s visokopozitivnom ekspresijom, dok je samo pet ispitanika kontrolne grupe pokazalo sličan rezultat. U eksperimentalnoj grupi su najučestaliji bili ispitanici s umjereno pozitivnom, a potom sa slabo pozitivnom ekspresijom MMP-9, dok su u kontrolnoj samo tri ispitanika imala visokopozitivan rezultat. Prediktorski model je dokazao statistički značajan prediktivni uticaj prisustva holesteatoma za nastanak osteodestrukcije spoljašnjeg slušnog kanala i kavuma timpani. Vjerovatnoća osteodestrukcije zidova spoljašnjeg slušnog kanala i kavuma timpani je bila statistički značajno veća kod ispitanika s visokopozitivnom ekspresijom TNF-R2. U odnosu na nivo ekspresije IL-1 i MMP-9, nije uočena značajna korelacija s opisanom patomorfološkom promjenom.

*Abramson i Huang* pronalaze u epitelnom sloju holesteatoma enzime kolagenaze i hidrolaze, odgovorne za destrukciju kosti, dok *Thomsen* i saradnici potvrđuju hipotezu enzimatskog koncepta, sugerijući da kolagenaze koje su proizvele komponente vlaknastih i skvamoznih epitelnih tkiva uzrokuju eroziju kosti [224, 225]. *Ruedi i Tumarkin* sugeriju da resorpcija kosti može nastati kao rezultat pritiska holesteatoma na površni sloj slušnih kočića [226, 227]. *Thomsen* i *Sade* sa saradnicima u svojim istraživanjima pronalaze kontinuirano prisustvo inflamatornog procesa u neposrednom okruženju erodiranih slušnih kočića. Autori sugeriju da se inflamatori proces može smatrati za uzrok osikularne resorpcije [228, 229]. *Kranc* i saradnici pronalaze da su oštećenja koštanog tkiva posljedica

aktivnih procesa resorpcije, a ne nekroze. Autori ističu da ćelije aktivno učestvuju u mehanizmima demineralizacije, erozije i destrukcije kosti [230].

Rezultati istraživanja su u skladu s podacima iz literature. *Yetiser* i saradnici su pronašli značajno više nivoe TNF- $\alpha$ , IL-1 i EGF kod 23 ispitanika s hroničnom upalom srednjeg uha i holesteatomom u odnosu na 16 ispitanika bez prisustva holesteatoma i zaključili da je destrukcija kosti posredovana ovim citokinima [109]. Slično ispitivanje su takođe sproveli *Akimoto* i saradnici, koji su pronašli značajno više nivoe TNF- $\alpha$  i IL-1 u tkivu inflamiranog kongenitalnog i stečenog holesteatoma u poređenju s kožom spoljašnjeg slušnog kanala [231]. *Li Z* i saradnici izvještavaju da visoki nivoi TNF- $\alpha$  u tkivu holesteatoma djeluju direktno, uzrokujući eroziju kostiju kao autokrini faktor rasta, a indirektno kao važan medijator, podstičući oslobođanje enzima koji uzrokuju destrukciju kosti [232]. *Olszewska* i saradnici ističu značaj nekoliko faktora odgovornih za koštanu resorpciju kao što su inflamacija, lokalni pritisak i specifični citokeratini [44]. *Suchozebrska-Jesionek* i saradnici dokazuju prekomjernu ekspresiju i višu stopu aktivacije MMP-9 kod holesteatoma u odnosu na zdravu kožu spoljašnjeg slušnog kanala, što ukazuje da MMP-9 može imati značajnu ulogu u molekularnim mehanizmima invazije holesteatoma u okolno koštano tkivo srednjeg uha [233]. *Wang H* i saradnici ističu da povišena aktivnost MMP-2 i MMP-9 kod holesteatoma može imati vitalnu ulogu u destrukciji kosti, a slične zaključke iznose i *Schonermark* i saradnici koji takođe otkrivaju snažnu povezanost izražene aktivnosti MMP s procesom osteodestrukcije zbog holesteatoma [148, 234].

Destrukcija osikularnog lanca je zabilježena kod 78 ispitanika eksperimentalne i 17 kontrolne grupe. Najveću učestalost u eksperimentalnoj grupi su pokazali ispitanici koji su imali visokopozitivnu ekspresiju TNF-R2 i IL-1 i skorom 0<sub>3</sub> i 0<sub>1</sub> destrukcije osikularnog lanca. Prediktorski model je pokazao da se holesteatom može smatrati statistički značajnim prediktorom težih stepena destrukcije osikularnog lanca. Uočena je statistički značajna povezanost ekspresije TNF-R2 i IL-1 s destrukcijom osikularnog lanca gdje se kod ispitanika sa negativnom ekspresijom TNF-R2 i negativnom i slabo pozitivnom IL-1 mogu očekivati niži stepeni destrukcije osikularnog lanca.

U eksperimentalnoj grupi, ispitanici sa skorom 0<sub>3</sub> destrukcije osikularnog lanca i visokopozitivnom ekspresijom MMP-9 su pokazali najveću učestalost. U kontrolnoj grupi su najzastupljeniji bili ispitanici s intaktnim osikularnim lancem (0<sub>0</sub>) koji su imali negativnu i slabo pozitivnu ekspresiju MMP-9. Prediktorski model je pokazao da se holesteatom može smatrati statistički značajnim prediktorom višeg stepena destrukcije osikularnog lanca.

U odnosu na nivoje ekspresije MMP-9 nije uočena statistički značajna povezanost s destrukcijom osikularnog lanca.

*Tos* i saradnici, ispitujući osikularni lanac kod 1150 slučajeva hronične upale srednjeg uha, utvrđuju najveću učestalost oštećenja kod inkusa, potom stapesa i maleusa [235]. *Palomar* i saradnici ističu da je inkus u 100% slučajeva bio invoviran kod oštećenja osikularnog lanca [236]. *Chole* i saradnici pronalaze djelimično ili potpuno oštećenje slušnih koščica kod 80% bolesnika s holesteatomom, a da stopa erozije osikularnog lanca kod hronične upale srednjeg uha bez holesteatoma iznosi 20% [237]. *Swartz* i saradnici navode destrukciju osikularnog lanca kao najčešću komplikaciju holesteatoma i da stepen oštećenja zavisi od primarne lokalizacije i proširenosti holesteatoma. Autori pronalaze intaktan osikularni lanac u 26% slučajeva atik holesteatoma, a najveću destrukciju kod dugog nastavka inkusa, potom tijela inkusa i glave maleusa [238]. *Amar* i saradnici u kliničkoj i biohemijskoj studiji destrukcije kosti kod holesteatoma srednjeg uha pronalaze izuzetno visoku stopu destrukcije osikularnog lanca, koja je iznosila 91,5%. Autori su takođe dokazali statistički značajnu korelaciju stepena ekspresije TNF alfa s destrukcijom osikularnog lanca, gdje je biohemski indeks ispitivanog biomarkera bio statistički značajno niži kod holesteatomom uzrokovane erozije jedne slušne koščice nasuprot erozije proširene na dvije ili tri slušne koščice [112]. *Wu Yi* saradnici dokazuju statistički značajnu povezanost visokih nivoa ekspresije MMP-2, MMP-9 i IL-6 u serumu bolesnika s holesteatomom srednjeg uha sa stepenom destrukcije osikularnog lanca [197].

Kod 151 (84,8%) ispitanika u ukupnom uzorku uočen je patološki nalaz na sluznici kavuma timpani. Razlika u distribuciji ispitanika prema ispitivanoj patomorfološkoj promjeni se pokazala kao statistički značajna ( $p<0,01$ ), gdje su hipertrofija sluznice u kontrolnoj grupi (43,2%) i granulacija u eksperimentalnoj (56,7%) pokazale najveću učestalost. U obje grupe je забиљежена visokopozitivna ekspresija TNF-R2 i IL-1, dok je po pitanju rezultata MMP-9 najveću učestalost u eksperimentalnoj grupi pokazala visokopozitivna, a u kontrolnoj negativna ekspresija. Prediktorski model koji je obuhvatao stepen ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 u odnosu na tkivo holesteatoma i kontrolno tkivo inflamirane sluznice kavuma timpani, dokazao je statistički značajnu predikciju prisustva holesteatoma na patološke promjene sluznice kavuma timpani, odnosno pojavu hipertrofije sluznice i granulacija. Takođe je dokazana statistički značajno veća vjerovatnoća prisustva granulacija kod visokopozitivne ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 i hipertrofije sluznice kod visokopozitivne ekspresije TNF-R2 i IL-1.

*Akimoto* i saradnici navode da je većina stečenih holesteatoma povezana s inflamatornim ćelijskim infiltratom. Autori pronalaze prisustvo granulacija kod stečenog, za razliku od kongenitalnog holesteatoma, ali i statistički značajnu korelaciju nivoa ekspresije TNF- $\alpha$  sa stepenom infekcije i koštane resorpcije, za razliku od nivoa ekspresije IL-1. U istoj studiji nisu utvrdili statsitički značajnu korelaciju nivoa ekspresije TNF- $\alpha$  i IL-1 s prisustvom granulacija kod stečenog holesteatoma [231]. *Kuczkowski* i saradnici pronalaze visoke nivoe ekspresije IL-1, TNF- $\alpha$  i IL-6 u granulacionom i tkivu holesteatoma. Autori ističu da snažna pozitivna povezanost između nivoa tih citokina i stepena osteolize kosti ukazuje na destruktivno ponašanje holesteatoma ili granulacionog tkiva [209]. *Yetiser* i saradnici dokazuju da nema statističkih razlika u nivoima ekspresije TNF- $\alpha$  i IL-1 između granulacionog i tkiva kože spoljašnjeg slušnog kanala, dok *Kim* i saradnici u svojoj studiji pronalaze značajno veće nivoe ekspresije IL-1 mRNA u granulacionom nasuprot tkiva zdrave kože i holesteatoma [109, 239]. *Schmidt* i saradnici ističu da se ekspresija MMP-9 uglavnom dešava u suprabazalnim, a rjeđe u bazalnim slojevima epitela holesteatoma, kao i u upalnim ćelijama perimatriksa za razliku od keratinocita i granulacionog tkiva [149]. *Schönermark* i saradnici pronalaze ekspresiju MMP-9 i MMP-2, ograničenu samo na basalne i suprabazalne epitelne ćelijske slojeve holesteatoma za razliku od mukoznog sloja kavuma timpani i membrane timpani [148].

Razlika između ispitanika obje grupe po pitanju statusa timpanalnog ušća Eustahijeve tube se pokazala statistički značajnom. U eksperimentalnoj grupi su najzastupljeniji bili ispitanici s opstrukcijom timpanalnog ušća Eustahijeve tube i visokopozitivnom ekspresijom TNF-R2, IL-1 i MMP-9. U kontrolnoj grupi su najveći učestalsot pokazali ispitanici s prohodnim timpanalnim ušćem i visokopozitivnom ekspresijom TNF-R2, IL-1 i negativnom ekspresijom MMP-9. Prediktorski model koji je obuhvatao stepen ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 u odnosu na tkivo holesteatoma i kontrolno tkivo inflamirane sluznice kavuma timpani, dokazao je statistički značajan prediktivni uticaj prisustva holesteatoma i visokih nivoa ekspresije ispitivanih biomarkera na pojavu opstrukcije i neprohodnosti timpanalnog ušća Eustahijeve tube.

*Monsell* i saradnici ističu da disfunkcija Eustahijeve tube čini osnovu patofiziologije upalnog procesa srednjeg uha, atelektaze membrane timpani i holesteatoma [240]. *Kemppainen* i saradnici dokazuju da je učestalost holesteatoma mnogo veća kod permanentne disfunkcije Eustahijeve tube, kao što je to slučaj kod pacijenata s rascjepom nepca [1]. *Wolfman* i saradnici u svom istraživanju dokazuju da se nastanak i razvoj retrakcionog holesteatoma može eksperimentalno dokazati ometanjem funkcije Eustahijeve

tube na animalnom modelu [241]. *Maeda* i saradnici u eksperimentalnoj studiji ekspresije citokina na animalnom modelu navode ključnu ulogu blokade Eustahijeve tube u nastanku hroničnog sekretornog otitisa. Autori pronalaze značajno visoku, endotoksinima indukovana, ekspresiju TNF-alfa, za razliku od IL-1  $\beta$  i IFN  $\gamma$ , odgovornu za proizvodnju mukusa i patohistološke promjene sluznice srednjeg uha, karakteristične za hronični sekretorni otitis [242].

Ispitivanjem rezultata ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 u ćelijama perimatriksa holesteatoma i kontrolnom tkivu inflamirane sluznice srednjeg uha, utvrđena je statistički značajna razlika između ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe. Visokopozitivna ekspresija TNF-R2 i MMP-9 je pokazala statistički značajno veću učestalost u ćelijama perimatriksa holesteatoma, za razliku od kontrolnog tkiva inflamirane sluznice srednjeg uha gdje je visokopozitivna ekspresija IL-1 bila statistički značajno učestalija. Dokazani visoki stepen ekspresije TNF-R2 i MMP-9 u ćelijama perimatriksa holesteatoma je u skladu s rezultatima studija koje su istraživale sličnu problematiku iz dostupne naučne literature i baza podataka, za razliku od rezultata ekspresije IL-1. Potencijalna objašnjenja dobijenog rezultata mogla bi da se temelje na povezanosti stepena ekspresije IL-1 s patohistološkim, imunohistohemijskim i kliničkim karakteristikama holesteatoma za vrijeme uzimanja uzorka. Istraživanja su dokazala značajnu povezanost nivoa ekspresije IL-1 sa slabim stepenom inflamacije, niskim indeksom bakteriološkog uzročnika u tkivu holesteatoma i upotrebljem antibiotske terapije neposredno prije i tokom operativnog zahvata [216, 231].

*Vitale* i saradnici, istražujući ekspresiju TNF-R2 receptora kod stečenog holesteatoma srednjeg uha, dokazuju značajno visoke nivoje ispitivanog biomarkera u matriksu holesteatoma. Autori nisu dokazali značajnu povezanost TNF-R2 receptora sa stepenom upalnog procesa kod stečenog holesteatoma srednjeg uha [85]. Međutim, *Yan* i *Huang*, analizirajući pet eksperimentalno indukovanih holesteatoma na animalnim modelu i pet hirurški odstranjenih fragmenata holesteatoma humanog porijekla, otkrivaju značajno povišenu ekspresiju TNF- $\alpha$  u holesteatomskom, ali i u okolnom granulacionom tkivu te ističu značaj navedenog citokina u procesu resorpcije kosti [105]. *Sastray* i saradnici su dokazali značajno više preoperativne nivoje koncentracije TNF- $\alpha$  u serumu ispitanika, koji su operativno tretirani zbog holesteatoma srednjeg uha u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika. Takođe su utvrdili značajnu povezanost koncentracije TNF- $\alpha$  sa stepenom koštane destrukcije [193]. *Yong-Soo* i saradnici su, istražujući značaj TNF- $\alpha$  kod hroničnog sekretornog otitisa na animalnom modelu, indukovanim s endotoksinom *Pseudomonas aeruginosa*, naglasili mogućnost inhibicije upalnog procesa primjenom TNF- $\alpha$  antagonista,

kao što je rekombinantni humani TNF receptor tip I (eng. *sTNF RI - Recombinant Human soluble TNF receptor Type I*), što može imati izuzetan značaj u tretmanu navedenog oboljenja, prevenciji komplikacija i nastanka holesteatoma [108]. *Chung i Yoon* su separacijom subepitelnog od epitelnog sloja holesteatoma i kultivacijom tkiva dokazali da izvjesne supstance iz perimatriksa imaju sposobnost da stimulišu matriks holesteatoma da produkuje IL1 i IL-8, što rezultira resorpcijom kosti [243]. *Yetiser* i saradnici su, ispitujući nivo ekspresije IL-1 i TNF- $\alpha$  u tkivu ispitanika s hroničnim otitisom, pronašli značajno više nivo navedenih citokina u grupi ispitanika s holesteatomom i zaključili da je koštana destrukcija posredovana navedenim citokinima [109]. *Akimoto* i saradnici pronalaze značajno više nivo ekspresije TNF- $\alpha$  i IL-1 kod inflamiranih kongenitalnih i stečenih holesteatoma u odnosu na tkivo kože spoljašnjeg slušnog kanala [231]. *Marendra i Aufdemorte* su istraživali prisustvo TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  1, -2 i IL-1, -6 u hirurški prikupljenim uzorcima holesteatoma i komparirali s uzorcima zdrave kože spoljašnjeg slušnog kanala. Autori su imunolokalizovali značajno visoku ekspresiju navedenih citokina u epitelnom sloju i subepitelnoj stromi holesteatoma za razliku od bazalnih slojeva i kože spoljašnjeg slušnog kanala. Autori ističu značaj involviranih TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6 u proces inflamacije i rezultirajuće pregradnje povezane s holesteatomom [111].

*Schmidt* i saradnici, ispitujući indukciju MMP u keratinocitima debrisa holesteatoma i isjećima granulacionog tkiva, otkrivaju da su induktivni faktori regulacije MMP-9 u granulacionom i tkivu debrisa holesteatoma EGF, IL-1  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$  i TGF- $\beta$ , koji djelimično potiču iz samog epitela i stromalnih ćelija ispod [149]. *Suchozebrska-Jesionek* i saradnici, istražujući proteolitičku aktivnost MMP-2 i MMP-9, dokazuju značajno višu ekspresiju ispitivanih biomarkera u holesteatomskom tkivu srednjeg uha u odnosu na tkivo zdrave kože spoljašnjeg slušnog kanala. Autori zaključuju da prekomjerna ekspresija MMP-2 i MMP-9 i manjoj mjeri može biti uključena u molekularne mehanizme invazivnosti holesteatoma i koštane destrukcije [233]. *Schönermark* i saradnici u imunohistohemijskoj studiji dokazuju da je ekspresija MMP-2, -3, -9 strogo ograničena na bazalni i suprabazalni ćelijski sloj holesteatoma, dok je ekspresija MMP-8 pokazala širenje i u područje epitela i granulacionog tkiva. Autori ističu da bi članovi familije MMP mogli igrati aktivnu ulogu u molekularnim mehanizmima invazije holesteatoma u temporalnu kost, što daje nove uvide u patofiziologiju bolesti i potencijalne terapijske pristupe [148]. *Zhu, Xie i Wang* su u imunohistohemijskom istraživanju ekspresije MMP-2 i MMP-9 kod holesteatoma i karcinoma srednjeg uha dokazali direktnu povezanost između ispitivanih biomarkera i

holesteatoma. Autori zaključuju da je poremećaj između MMP i njihovih inhibitora bio jedan od razloga resorpcije kosti u slučajevima holesteatoma i karcinoma srednjeg uha [244].

Iako nije utvrđena statistički značajna razlika po pitanju distribucije pojedinih tipova holesteatoma (atik, tensa, sinus timpani) u odnosu na rezultate ekspresije TNF-R2 i IL-1, najveću učestalost kod atik i sinus timpani holesteatoma je pokazala visokopozitivna ekspresija TNF-R2 i IL-1. Visokopozitivna ekspresija MMP-9 je najzastupljenija bila kod sinus timpani i tensa holesteatoma. Međutim, kod atik tipa holesteatoma je dobijen kontroverzan rezultat, gdje je negativan rezultat ekspresije MMP-9 pokazao dominantnu zastupljenost. Po pitanju lokalizacije i proširenosti holesteatoma, visokopozitivna ekspresija TNF-R2 i IL-1 je pokazala statistički značajnu učestalost kod difuzno proširenog i holesteatoma lokalizovanog u području atika, antruma i/ili mastoidnog nastavka. Visokopozitivna ekspresija MMP-9 je pokazala najveću, ali ne i statistički značajnu zastupljenost kod difuzno proširenog holesteatoma.

*Kuczkowski* i saradnici, upoređujući nivoe proinflamatornih citokina TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 i IL-10 u holesteatomu s patološkim kliničkim faktorima, dokazuju pozitivnu korelaciju između stepena osteodestrukcije i invazivnosti holesteatoma. Autori ističu da povišen nivo proinflamatornih citokina u holesteatomu može prouzrokovati pogoršanje hroničnog upalnog procesa i nastanak komplikacija [209]. *Amar* i saradnici takođe pronalaze statistički značajno više koncentracije TNF- $\alpha$  u tkivu ekstenzivno proširenih holesteatoma, bazirano na broju erozivnih procesa na osikulama i kanalu facijalnog nerva i denudirane tvrde moždane ovojnica i sigmoidnog sinusa [112]. *Banerjee* i saradnici, istražujući stepen ekspresije MMP-2 i MMP-9 u tkivu holesteatoma i kože spoljašnjeg slušnog kanala, utvrđuju statistički značajno visoke nivo ekspresije ispitivanih biomarkera u tkivu ekstenzivno proširenih holesteatoma [245].

Statističkom analizom razlike distribucije ispitanih obje grupe prema mikrobiološkom nalazu brisa uha na biogram i antibiogram i vrsti izolovanog bakteriološkog uzročnika, nije utvrđena statistička značajnost. U ukupnom uzorku, najveću procentualnu zastupljenost su pokazali ispitani s pozitivnim nalazom brisa uha (55,6%), a prema vrsti izolovanog bakteriološkog uzročnika, *Staphylococcus aureus* (43,6%) i *Pseudomonas aeruginosa* (34%). Prediktorski model koji je obuhvatao stepen ekspresije TNF-R2 u odnosu na tkivo holesteatoma i kontrolno tkivo inflamirane sluznice kavuma timpani, dokazao je statistički značajan prediktivni uticaj visokopozitivne ekspresije TNF-R2 na pozitivan rezultat mikrobiološkog nalaza brisa uha, za razliku od stepena ekspresije IL-1 i MMP-9 i

prisustva holesteatoma. Nije dokazan statistički značajan uticaj ispitivanih prediktora na vrstu izolovanog bakteriološkog uzročnika.

*Yung* i saradnici navode da inficirani holesteatomi u odnosu na neinficirane, pokazuju značajno veća agresivna svojstva što rezultira većim stepenom koštane resorpcije, destrukcijom okolnih koštanih struktura i povećanjem veličine holesteatoma [246]. *Nason* i saradnici ističu da bakterijski LPS, kao vrlo jaki antigeni iz *Pseudomonas aeruginosa* (najčešće izolovane bakterije inficiranog holesteatoma) čine vrlo moćne induktore osteoklastogeneze. Autori su dokazali RT-PCR (eng. *Reverse transcription polymerase chain reaction; lančana reakcija polimeraze reverznom transkriptazom*) analizom LPS-indukovanu ekspresiju receptora za IL-1 i TNF- $\alpha$  u prekursorima osteoklasta temeljenih na RANKL [247]. *Hammed* i saradnici ističu da bakterijski biofilm u holesteatomu ima značajnu ulogu u procesu hronične inflamacije, proliferacije i osteodestrukcije. Prisustvo bakterijskog biofilma kod hronične upale srednjeg uha sa holesteatomom pokazuje veliku učestalost, dok je keratinski sloj holesteatoma najčešća lokalizacija za njegov rast i razvoj [248]. *Lee* i saradnici u studiji ispitivanja ekspresije PRRs u kulturama uzoraka holesteatoma dokazuju prisustvo koagulaza negativnog stafilocoka (eng. *CNS - Coagulase-negative Staphylococcus*), *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* kao najučestalijih bakterioloških uzročnika. Autori ističu vrlo značajnu ulogu infekcije u indukciji PRRs signalnih puteva [195].

Iako prediktorski model nije dokazao statistički značajnu povezanost prisustva holesteatoma i rezultata ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 s vrijednostima postoperativnog PTA i ABG, ipak je uočeno poboljšanje sluha kod ispitanika obje grupe, odnosno postoperativno smanjenje prosječnih vrijednosti PTA i ABG, značajnije kod negativne i slabo pozitivne ekspresije ispitivanih biomarkera.

Analizom razlike distribucije ispitanika obje grupe po pitanju udjela ispitanika s postoperativnim PTA<40 dB, nije utvrđena statistička značajnost. U obje grupe su bili najzastupljeniji ispitanici koji su imali postoperativni prag sluha > 40dB i visokopozitivnu ekspresiju TNF-R2 i IL-1. U eksperimentalnoj grupi su najveću učestalost pokazali ispitanici s visokopozitivnom, a u kontrolnoj s negativnom ekspresijom MMP-9. Nije utvrđena statistički značajna predikcija prisustva holesteatoma i rezultata ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 na udio ispitanika s postoperativnim PTA<40 dB. Nije utvrđena statistički značajna razlika između obje grupe u odnosu na poboljšanje postoperativnog PTA>15dB. U obje grupe su bili najzastupljeniji ispitanici koji nisu imali postoperativno poboljšanje PTA>15dB i visokopozitivnu ekspresiju TNF-R2 i IL-1. Po pitanju ekspresije MMP-9, u

eksperimentalnoj grupi su najveću učestalost pokazali ispitanici s umjerenom, negativnom i slabo pozitivnom, a u kontrolnoj s negativnom ekspresijom MMP-9. Prisustvo holesteatoma i rezultati ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 nisu pokazali statistički značajan prediktivni uticaj na postoperativno poboljšanje PTA>15dB.

Razlika u distribuciji ispitanika po pitanju postoperativnog ABG<20 dB između obje grupe nije bila statistički značajna. U obje grupe su najveću učestalost pokazali ispitanici, koji su imali postoperativni ABG>20 dB. U eksperimentalnoj grupi su najzastupljeniji bili ispitanici s visokopozitivnom ekspresijom TNF-R2, IL-1 i MMP-9, dok su nivoi ekspresije TNF-R2 u kontrolnoj bili relativno izbalansirani. Prisustvo holesteatoma se pokazalo statistički značajnim prediktorom za postoperativne vrijednosti ABG>20 dB, dok rezultati ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 nisu pokazali predikciju takvog stepena značajnosti.

Molekularni mehanizmi nastanka oštećenja sluha, uključujući senzorneuralno oštećenje kao sekvele hronične upale srednjeg uha, još su predmet naučnih istraživanja. Transfer medijatora inflamacije kroz membranu okruglog prozora u skalu timpani je takođe indikativan [5, 68]. Razni prognostički faktori mogu imati potencijalni uticaj na funkcionalne rezultate hirurškog liječenja hronične upale srednjeg uha [174, 175]. Yuehua i saradnici su u eksperimentalnoj studiji na animalnom modelu dokazali povišenu ekspresiju TNF- $\alpha$  i IL-6 u skali timpani i limfocitnu infiltraciju u skali vestibuli kohlee, inficirane s citomegalovirusom (CMV), što može posredovati i upravljati lokalni upalni odgovor i finalno dovesti do oštećenja tkiva i senzorneuralnog oštećenja sluha [249].

MacArthur i saradnici su dokazali na animalnom modelu prekomjernu ekspresiju brojnih citokinskih gena u hronično inflamiranom tkivu unutrašnjeg uha, povezanih sa ćelijskom inflamatornom proliferacijom (IL-1  $\alpha$ , i IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-6), remodeliranjem tkiva (TNF- $\alpha$ , BMP - *Bone morphogenetic protein*; koštani morfogenetski protein, FGF - *Fibroblast growth factor*; faktor rasta fibroblasta) i angiogenezom (VEGF  $\alpha$ ). Rezultati istraživanja ukazuju da su kohlearna tkiva sposobna eksprimirati citokinsku mRNA, zaduženu za proces upale i remodeliranja, što daje potencijalnu molekularnu osnovu za prolazni ili trajni senzorneuralni gubitak sluha, često prisutan kod akutnog i hroničnog upalnog procesa srednjeg uha. Autori ističu da rezultati studije impliciraju na potencijalnu molekularnu osnovu prolaznog ili trajnog senzorneuralnog oštećenja sluha [250].

Ghaheri i saradnici ističu značaj kohlearnih gena, prilično sposobnih u adekvatnoj reakciji na upalni stimulus, u mehanizmu potencijalnog oštećenja kohlee, pored već poznatog mehanizma difuznog prolaza upalnih medijatora kroz membranu okruglog prozora, kao uzroka senzorneuralnog oštećenja sluha kod hroničnog otitisa [251].

*Rezende* i saradnici su utvrdili povišenu ekspresiju gena matriksnih metaloproteinaza (MMP-2, MMP-3, MMP-13) i njihovog tkivnog inhibitora TIMP1 (eng. *TIMP1 - Tissue inhibitors of metalloproteinases 1*) u tkivu holesteatoma, ali ne i MMP-9. Autori nisu pronašli povezanost ekspresije gena MMP i TIMP1 s težinom bolesti zasnovane na kliničkoj istoriji, audiometrijskom i radiološkom nalazu pacijenta [152].

Po pitanju orofaringoskopskog nalaza palatinalnih tonzila, utvrđena je statistički značajna razlika između obje grupe, gdje su tonzilektomirani ispitanici u eksperimentalnoj grupi (17,5%) pokazali statistički značajno veću učestalost u odnosu na ispitanike kontrolne (7,4%). Kod ispitanika obje grupe s prisustvom tonsilarnog tkiva, zabilježena je visoka ekspresija TNF-R2 i IL-1. Po pitanju ekspresije MMP-9 u eksperimentalnoj grupi su najveću učestalost pokazali ispitanici s visokopozitivnom ekspresijom, a u kontrolnoj s negativnom. Prediktorski model, koji je obuhvatao prisustvo holesteatoma i rezultate ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9, pokazao je da postoji značajno veća vjerovatnoća odsustva palatinalnih tonzila ili sprovedenih tonzilektomija u prisustvu holesteatoma.

Iako je bila relativno niska, razlika između obje grupe po pitanju tipa hroničnog tonsilitisa se nije pokazala statistički značajnom. Ispitanici s hipertrofičnim tipom (57,5%) su bili najzastupljeniji u eksperimentalnoj, a s atrofičnim (57,3%) u kontrolnoj grupi. Kod ispitanika obje grupe s hipertrofičnim i atrofičnim tipom hroničnog tonsilitisa dokazana je visoka ekspresija TNF-R2 i IL-1. Ispitanici s hipertrofičnim tipom u eksperimentalnoj grupi su imali visoku, a s atrofičnim negativnu ekspresiju MMP-9. U kontrolnoj grupi je kod oba tipa hroničnog tonsilitisa zabilježena negativna ekspresija MMP-9. U odnosu na rezultate ekspresije IL-1, prisustvo holesteatoma je imalo statistički značajan prediktivni uticaj za prisustvo hipertrofičnog tipa hroničnog tonsilitisa.

U odnosu na kliničku procjenu veličine palatinalnih tonzila, najveću učestalost su pokazali ispitanici s gradusom 0 (48,4%) i 2 (27,1%). Razlika u distribuciji ispitanika obje grupe u odnosu na stepen veličine palatinalnih tonzila se nije pokazala statistički značajnom. Kod ispitanika s gradusom 0 i 2 u obje grupe je dokazana visoka ekspresija TNF-R2 i IL-1. Sličan rezultat je zabilježen kod ispitanika obje grupe s gradusom 2 kod kojih je uočena visoka ekspresija MMP-9, za razliku od grupe s gradusom 0. Prisustvo holesteatoma i rezultati ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 nisu imali statistički značajan prediktivni uticaj po pitanju veličine palatinalnih tonzila.

*Harabuchi*, istražujući vrlo kompleksnu korelaciju poremećaja *Waldeyer*-ovog limfatičnog prstena i srednjeg uha, ističe značaj signalizacije TLR1 receptora u indukciji tkiva nazofaringealne i palatinalne tonzile da produkuju proinflamatorne citokine, hemokine

i prirodne antimikrobne molekule koje imaju ključnu ulogu u razvoju upale srednjeg uha [252]. *Hoefakker* i saradnici pronalaze u ekstrafolikularnom području humanih palatinalnih tonsila specifične ćelije koje produkuju pojedine citokine i antitijela. Autori dokazuju da makrofagi produkuju IL-1 $\alpha$  i TNF- $\alpha$ , a T ćelije interdigitirajuće dendritske ćelije (eng. *IDC - Interdigitating dendritic cells*), IL-2, IL-4 i IFN- $\gamma$  [253]. U sličnom istraživanju, *Andersson* i saradnici pronalaze da intraepitelne T ćelije u vanfolikularnom prostoru mogu proizvesti veću količinu citokina IL-2, IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$ , dok prisustvo pojedinih citokina, poput IL-8 i IL-1 $\alpha$  dokazuju samo u epitelu tonsilarnih kripti [254]. *Passali* i saradnici u svojoj studiji identifikuju visoke tkivne koncentracije TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6 kao odraz lokalne prekomjerne produkcije od aktiviranih monocita i makrofaga, ponovnim stimulacijama patogenih agensa. Autori navode da visoki nivoi ispitivanih citokina, dugoročno slabe imunološku aktivnost i izazivaju štetne efekte. Hroničnu upalnu bolest, na nivou palatinalnih tonsila, s makroskopskog aspekta, u dječjoj dobi karakteriše hiperplazija i hipertrofija, dok je za odraslu dob češće prisutna skleroza tonsilarnog tkiva [157]. *Kim* i saradnici ističu da visoka ekspresija pojedinih medijatora upalnog odgovora (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$ ) kod ispitanika s opstruktivnom "sleep apnea" podupire hipotezu po kojoj povećani lokalni i sistemski upalni odgovor podstiče tonsilarnu proliferaciju [255].

## **7. ZAKLJUČCI**

1. Holesteatom srednjeg uha je statistički značajan prediktor za pripadnost mlađoj starosnoj dobi do 16 godina u odnosu na ostale starosne grupe. Slabo pozitivna ekspresija TNF-R2 je statistički značajan prediktor za pripadnost starijoj životnoj dobi.
2. Visokopozitivna ekspresija TNF-R2, IL-1 i MMP-9 pokazuje najveću učestalost u eksperimentalnoj grupi kod ispitanika muškog, a u kontrolnoj kod ženskog pola. Holesteatom srednjeg uha ima pozitivan, a negativna ekspresija TNF-R2 negativan statistički prediktivni uticaj za pripadnost muškom polu.
3. Holesteatom srednjeg uha je statistički značajan prediktor upotrebe antibiotske terapije tokom dužeg vremenskog perioda. Visokopozitivna ekspresija TNF-R2, IL-1 i MMP-9 je statistički značajan prediktor upotrebe antibiotske terapije iz reda hinolona.
4. Holesteatom srednjeg uha i visokopozitivna ekspresija IL-1 i MMP-9 su statistički značajni prediktori prisustva ivičnog tipa perforacije membrane timpani u eksperimentalnoj, a negativna ekspresija MMP-9 centralnog tipa u kontrolnoj grupi. Holesteatom srednjeg uha i visokopozitivna ekspresija IL-1 su statistički značajni prediktori prisustva atik i zadnjeg-ivičnog podtipa, a negativna i slabo pozitivna ekspresija MMP-9 atik podtipa perforacije membrane timpani.
5. Holesteatom srednjeg uha i stepen ekspresije TNF-R2 i IL-1 su statistički značajni prediktori koštane destrukcije spoljašnjeg slušnog kanala i kavuma timpani u odnosu na kontrolno tkivo inflamirane sluznice srednjeg uha. Holesteatom srednjeg uha je statistički značajan prediktor težeg stepena destrukcije osikularnog lanca. Negativna ekspresija TNF-R2 i IL-1 je statistički značajan prediktor nižeg stepena destrukcije osikularnog lanca.
6. Holesteatom srednjeg uha i visokopozitivna ekspresija TNF-R2, IL-1 i MMP-9 su statistički značajni prediktori prisustva hipertrofične sluznice i granulacija u kavumu timpani.
7. Stepen ekspresije TNF-R2 i MMP-9 je statistički značajno veći u ćelijama perimatriksa stečenog holesteatoma srednjeg uha u odnosu na kontrolno tkivo inflamirane sluznice srednjeg uha. U ćelijama perimatriksa najveću učestalost pokazuje visokopozitivna

ekspresija TNF-R2 i MMP-9 za razliku od inflamirane sluznice srednjeg uha gdje je visokopozitivna ekspresija IL-1 statistički značajno učestalija.

8. Visokopozitivna ekspresija TNF-R2 i IL-1 je statistički značajno učestalija kod difuzno proširenog i holesteatoma lokalizovanog u području atika, antruma i/ili mastoidnog nastavka. Visokopozitivna ekspresija MMP-9 pokazuje najveću, ali ne i statistički značajnu, učestalost kod difuzno proširenog holesteatoma.
9. U odnosu na vrstu izolovanog bakteriološkog uzročnika u mikrobiološkom nalazu brisa uha, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* pokazuju najveću učestalost. Visokopozitivna ekspresija TNF-R2 je statistički značajan prediktor za pozitivan mikrobiološki nalaz brisa uha.
10. Ispitanici s holesteatomom srednjeg uha imaju statistički značajno više srednje vrijednosti preoperativnog i postoperativnog prosječnog vazdušno-koštanog gepa u odnosu na ispitanike kontrolne grupe. Holesteatom srednjeg uha je statistički značajan prediktor pogoršanja sluha u odnosu na postoperativne vrijednosti vazdušno-koštanog gepa ispod 20 dB, dok rezultati ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 ne pokazuju predikciju takvog stepena značajnosti.
11. U odnosu na stepen ekspresije TNF-R2 i MMP-9, holesteatom srednjeg uha je statistički značajan prediktor sprovedenih tonzilektomija. U odnosu na rezultate ekspresije IL-1, holesteatom srednjeg uha je statistički značajan prediktor prisustva hipertrofičnog tipa tonzilitisa.
12. Stepen ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 može biti značajan prediktor u razvoju kliničke slike stečenog holesteatoma srednjeg uha i ukazivati na njegovo agresivno osteodestruktivno ponašanje s potencijalnim razvojem otogenih komplikacija. Medijatori inflamacije mogu imati značajan doprinos u kliničkoj evaluaciji i terapiji stečenog holesteatoma srednjeg uha i hronične upale srednjeg uha, što ukazuje na potrebu sprovođenja daljih istraživanja.

## 8. LITERATURA

1. Kemppainen HO, Puhakka HJ, Laippala PJ, Sipilä MM, Manninen MP, Karma PH. Epidemiology and aetiology of middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.* 1999;119(5):568-72.
2. Kurihara A, Toshima M, Yuasa R, Takasaka T. Bone destruction mechanisms in chronic otitis media with cholesteatoma: specific production by cholesteatoma tissue in culture of bone-resorbing activity attributable to interleukin-1 alpha. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1991;100(12):989-98.
3. Lessa HA, Freitas EB, Cruz OLM. Complicações das otites médias. In: SBORL. Tratado de otorrinolaringologia. São Paulo:Editora Roca, 2003;43-9.
4. De la Cruz A, Fayad JN. Detection and management of childhood cholesteatoma. *Pediatr Ann.* 1999;28(6):370-3.
5. Juhn SK, Jung MK, Hoffman MD, Drew BR, Preciado DA, Sausen NJ, et al. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of otitis media and sequelae. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2008;1:117-38.
6. Merchant SN, McKenna MJ, Rosowski JJ. Current status and future challenges of tympanoplasty. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1998;255(5):221-8.
7. Meyer TA, Strunk Jr CL, Lambert PR. Cholesteatoma. In: Bailey BJ, Johnson JT, Newlands SD, eds. Head and Neck surgery - Otolaryngology, 4th edn. Lippincott Williams and Wilkins;2083-91.
8. Semaan MT, Megerian CA. The pathophysiology of cholesteatoma. *Otolaryngol Clinic North Am.* 2006;39(6):1143-59.
9. Du Verney JG. Traité de l'organe de l'ouie, contenant structure. Les usages et les maladies des toutes les parties de l'oreille. E. Michallet, Paris;1683.
10. Chole RA, Sudhoff HH. Chronic Otitis Media, Mastoiditis, and Petrositis. In: Niparko JK, eds. Cummings Otolaryngology Head and neck surgery. 5th edn. Elsevier Mosby; 2010:1964-78.
11. Kazahaya K, Potsic WP. Congenital cholesteatoma, *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;12:398-403.
12. Merchant SN, Nadol JB. Schuknecht's Pathology of the Ear. 3rd Ed. Shelton, Connecticut: People's Medical Publishing House-USA;2010:244-59.
13. Bennett M, Warren F, Jackson GC, Kaylie D. Congenital cholesteatoma: theories, facts, and 53 patients. *Otolaryngol Clin North Am.* 2006;39:1081-94.
14. Harker LA. Cholesteatoma - an incidence Study. In McCabe BF, Sade J, Abramson M, Eds. First International Conference on Cholesteatoma. Birmingham: Aesculapius Publishing Co;1977:308-12.
15. Ruben RJ. The disease in society. Evaluation of chronic otitis media in general and cholesteatoma in particular. 2nd International Conference of Cholesteatoma and Mastoid Surgery. Kugler Publications, Amsterdam;1982:11-6.

16. Manolidis SL, Manolidis LS, Georgopoulos G. Epidemiology of Cholesteatoma. In: Tos M, Thomsen J, Peitersen E. Eds. Cholesteatoma and Mastoid Surgery. Kugler & Ghedini, Amsterdam;1989:331-3.
17. Padgham N, Mills R, Christmas H. Has the increasing use of grummetts influenced the frequency of surgery for cholesteatoma? *J Laryngol Otol*. 1989;103(11):1034-5.
18. Tos M. Incidence, etiology and pathogenesis of cholesteatoma in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1988;40:110-7.
19. Prinsley P. The genetics of Cholesteatoma. Doctoral thesis, University of East Anglia; 2016. (Citirano 6.7.2019.). Dostupno na: <https://ueaprints.uea.ac.uk/id/eprint/69528>
20. Khalid-Raja M, Tikka T, Coulson C. Cholesteatoma: a disease of the poor (socially deprived)? *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2015;272(10):2799-805.
21. Glasscock ME 3rd, Woods CI 3rd, Poe DS, Patterson AK, Welling DB. Petrous apex cholesteatoma. *Otolaryngol Clin North Am*. 1989;22(5):981-1002.
22. Verdaguer JM, Trinidad A, Lobo D, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. External auditory canal cholesteatoma as a complication of ear surgery. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2006;57:378-80.
23. Hartman JM, Stankiewicz JA. Cholesteatoma of the paranasal sinuses: case report & review of the literature. *Ear Nose Throat J*. 1991;70:719-25.
24. Moffat DA, Quaranta N, Baguley DM, Hardy DG, Chang P. Staging and management of primary cerebellopontine cholesteatoma. *J Laryngol Otol*. 2002;116:340-5.
25. Karabulut YY, Tek M, Eti N, Akbay E. Cholesteatoma in ectopic kidney. *Turk J Urol*. 2016;42(3):210-2.
26. Suetake M, Kobayashi T, Takasaka T. Bilateral congenital cholesteatomas associated with ossicular anomalies: a case report. *Am J Otol*. 1991;12:132-4.
27. Litman RS, Smouha E, Sher WH, Shangold LM. Two cases of bilateral congenital cholesteatoma-usual and unusual presentations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1996;36: 241-52.
28. Worley GA, Vats A, Harcourt J, Albert DM. Bilateral congenital cholesteatoma in branchio-oto-renal syndrome. *J Laryngol Otol*. 1999;113:841-3.
29. Persaud R, Hajioff D, Trindade A, Khemani S, Bhattacharyya MN, Papadimitriou N, et al. Evidence-based review of aetiopathogenic theories of congenital and acquired cholesteatoma. *J Laryngol Otol*. 2007;121(11):1013-9.
30. Smouha EE, Bojrab DI. Cholesteatoma. New York, NY: Thieme;2011:1-15.
31. Tos M. Manual of Middle Ear Surgery: Approaches, Myringoplasty, Ossiculoplasty and Tympanoplasty. New York: Thieme Medical Pub;1993:2.
32. Spremo, S. Hronične upale srednjeg uha. Banja Luka, Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci;2015:23-76.
33. Tos M, Lau T. Hearing after surgery for cholesteatoma using various techniques. *Auris Nasus Larynx*. 1989;16(2):61-73.
34. Sudhoff H, Tos M. Pathogenesis of attic cholesteatoma: clinical and immunohistochemical support for combination of retraction theory and proliferation theory. *Am J Otol*. 2000;21:786-92.
35. Sudhoff H, Tos M. Pathogenesis of sinus cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007;264:1137-43.

36. Mansour S, Magnan J, Nicolas K, Haidar H. Middle Ear Diseases: Advances in Diagnosis and Management. First edition. Cham: Springer; 2018.
37. Saleh HA, Mills RP. Classification and staging of cholesteatoma. *Clin Otolaryngol*. 1999;24:355-9.
38. Yung M, Tono T, Olszewska E, Yamamoto Y, Sudhoff H, Sakagami M, et al. EAONO/JOS Joint consensus statements on the definitions, classification and staging of middle ear cholesteatoma. *J Int Adv Otol*. 2017;13:1-8.
39. Đerić D, Jašović A. Otoološka morfologija i radiološka dijagnostika oboljenja srednjeg uva. Beograd: Medicinski fakultet; 1996:25-140.
40. Padovan I. Otorinolaringologija 1, Kirurgija uha. Zagreb: Školska knjiga; 1982:3-14.
41. Šercer A. Otorinolaringologija I. Zagreb: Jugoslovenski leksikografski zavod; 1996:47-9.
42. Wullstein RS. The epitympanum and ossicular chain. In: Marquet JFE, editors. *Surgery and Pathology of the Middle Ear*. Boston/Dordrecht/Lancaster: Martinus Nijhoff Publishers; 1984:61-64.
43. Proctor B. Surgical anatomy of the ear. New York: Thieme Medical Publishers Inc; 1989:1-218.
44. Morimitsu T. Cholesteatoma and Anterior Tympanotomy. Tokyo: Springer-Verlag; 1997:5-109.
45. Vital V. Pediatric cholesteatoma: personal experience and review of the literature. *Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2011;45:5-14.
46. Ferlito A. A review of the definition, terminology and pathology of aural cholesteatoma. *J Laryngol Otol*. 1993;107(6):483-8.
47. Lim DJ, Saunders WH. Acquired cholesteatoma: light and electron microscopic observations. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1972;81(1):1-11.
48. Olszewska E, Wagner M, Bernal-Sprekelsen M, Ebmeyer J, Dazert S, Hildmann H, et al. Etiopathogenesis of cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2004;261:6-24.
49. McHugh TP. Intracranial cholesteatoma: a case report and review. *J Emerg Med*. 2007;32(4):375-9.
50. Louw L. Acquired cholesteatoma pathogenesis: stepwise explanations. *J Laryngol Otol*. 2010;124(6):587-93.
51. Seibert JW, Danner CJ. Eustachian tube function and the middle ear. *Otolaryngol Clin North Am*. 2006;39:1221-35.
52. Dornelles C, Costa SS, Meurer L, Schweiger C. Some considerations about acquired adult and pediatric cholesteatomas. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2005;71:536-45.
53. Baráth K, Huber AM, Stämpfli P, Varga Z, Kollias S. Neuroradiology of cholesteatomas. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011;32(2):221-9.
54. Kuo CL. Etiopathogenesis of acquired cholesteatoma: prominent theories and recent advances in biomolecular research. *Laryngoscope*. 2015;125(1):234-40.
55. Karmody CS, Northrop C. The pathogenesis of acquired cholesteatoma of the human middle ear: support for the migration hypothesis. *Otol Neurotol*. 2012;33(1):42-7.
56. Chole RA, Tinling SP. Basal lamina breaks in the histogenesis of cholesteatoma. *Laryngoscope*. 1985;95(3):270-5.
57. Yamamoto-Fukuda T, Takahashi H, Koji T. Animal models of middle ear cholesteatoma. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:394241. doi: 10.1155/2011/394241.

58. Gray JD. The chronic ear. The treatment of cholesteatoma in children. *Proc R Soc Med*. 1964;57:769-71.
59. Sadé J. The buffering effect of middle ear negative pressure by retraction of the pars tensa. *Am J Otol*. 2000;21:20-3.
60. Monsanto RD, Pauna HF, Kaya S, Hızlı Ö, Kwon G, Paparella MM, et al. Epitympanum volume and tympanic isthmus area in temporal bones with retraction pockets. *Laryngoscope*. 2016;126(11):369-74.
61. Marchioni D, Alicandri-Ciufelli M, Molteni G, Artioli FL, Genovese E, Presutti L. Selective epitympanic dysventilation syndrome. *Laryngoscope*. 2010;20(5):1028-33.
62. Chole RA, McGinn MD, Tinling SP. Pressure-induced bone resorption in the middle ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1985;94:165-70.
63. McGinn MD, Chole RA, Tinling SP. Bone resorption induced by middle-ear implants. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1986;112(6):635-41.
64. Orisek BS, Chole RA. Pressures exerted by experimental cholesteatomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1987;113(4):386-91.
65. Kaneko Y, Yuasa R, Ise I, Iino Y, Shinkawa H, Rokugo M, et al. Bone destruction due to the rupture of a cholesteatoma sac: a pathogenesis of bone destruction in aural-cholesteatoma. *Laryngoscope*. 1980;90:1865-71.
66. Chen ZF, Darvell BW, Leung VW. Hydroxyapatite solubility in simple inorganic solutions. *Arch Oral Biol*. 2004;49(5):359-67.
67. Nguyen KH, Suzuki H, Ohbuchi T, Wakasugi T, Koizumi H, Hashida K, et al. Possible participation of acidic pH in bone resorption in middle ear cholesteatoma. *Laryngoscope* 2014;124(1):245-50.
68. Frickmann H, Zautner AE. Cholesteatoma - A Potential Consequence of Chronic Middle Ear Inflammation. *Otolaryngology: Current Research* 2012;5:1-8.
69. Hamed MA, Nakata S, Sayed RH, Ueda H, Badawy BS, Nishimura Y, et al. Pathogenesis and Bone Resorption in Acquired Cholesteatoma: Current Knowledge and Future Prospectives. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2016;9(4):298-308.
70. Welkoborsky HJ. Current concepts of the pathogenesis of acquired middle ear cholesteatoma. *Laryngorhinootologie*. 2011;90(1):38-48.
71. Caliman e Gurgel JD, Pereira SB, Alves AL, Ribeiro FQ. Hyperproliferation markers in ear canal epidermis. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76(5):667-71.
72. Bujia J, Holly A, Sudhoff H, Antoli-Candela F, Tapia MG, Kastenbauer E. Identification of proliferating keratinocytes in middle ear cholesteatoma using the monoclonal antibody Ki-67. *ORL J Otorhinolaryngol Rel Spec*. 1996;58:23-6.
73. Bujia J, Sudhoff H, Holly A, Hildmann H, Kastenbauer E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in middle ear cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1996;253:21-4.
74. Bassiouny M, Badour N, Omran A, Osama H. Histopathological and immunohistochemical characteristics of acquired cholesteatoma in children and adults. *Egypt J Ear Nose Throat Allied Sci*. 2012;13:7-12.
75. Klenke C, Janowski S, Borck D, Widera D, Ebmeyer J, Kalinowski J, et al. Identification of novel cholesteatoma-related gene expression signatures using full-genome microarrays. *PLoS One* 2012;7:e52718. (Citirano 9.12.2019.). Dostupno na: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0052718>

76. Jin BJ, Min HJ, Jeong JH, Park CW, Lee SH. Expression of EGFR and microvessel density in middle ear cholesteatoma. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2011;4:67-71.
77. Ergun S, Zheng X, Carlsoo B. Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in middle ear cholesteatoma. *Am J Otol.* 1996;17:393-6.
78. Choung YH, Park K, Kang SO, Markov Raynov A, Ho Kim C, Choung PH. Expression of the gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in human middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.* 2006;126:138-43.
79. James AL, Chadha NK, Papsin BC, Stockley TL. Pediatric cholesteatoma and variants in the gene encoding connexin 26. *Laryngoscope.* 2010;120:183-7.
80. Vitale RF, Pereira CS, Alves AL, Fregnani JH, Ribeiro FQ. TNF-R2 expression in acquired middle ear cholesteatoma. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2011;77:531-6.
81. Milewski C. Role of perimatrix fibroblasts in development of acquired middle ear cholesteatoma. A hypothesis. *HNO.* 1998;46:494-501.
82. Olszewska E, Chodynicki S. Immunological problems in middle ear cholesteatoma. *Otolaryngol Pol.* 2004;58:85-90.
83. Amador JM, Esquivias JJ, Ciges M. The study of proliferative epithelial activity in cholesteatoma of the middle ear during cytomorphophotometry. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 1994;45:71-8.
84. Albino AP, Reed JA, Bogdany JK, Sasoon J, Parisier SC. Increased numbers of mast cells in human middle ear cholesteatomas: implications for treatment. *Am J Otol.* 1998;19(3):266-72.
85. Vitale RF, Ribeiro Fde A. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2007;73:117-21.
86. Gersdorff MC, Debaty ME, Tomasi JP. Pathophysiology of cholesteatoma. *Rev Laryngol Otol Rhinol. (Bord)* 2006;127:115-9.
87. Cheshire IM, Blight A, Ratcliffe WA, Proops DW, Heath DA. Production of parathyroid-hormone-related protein by cholesteatoma cells in culture. *Lancet.* 1991;338:1041-3.
88. Cholesteatoma, an Overview Source: Grand Rounds Presentation Department of Otolaryngology - Head and Neck Surgery The University of Texas Medical Branch (UTMB) Health Date: May 22, 2013 (Citirano 09.09.2013.) Dostupno na: <https://www.utmb.edu/otoref/2010s-grand-rounds>.
89. Dennis RG, Whitmire RN, Jackson RT. Action of inflammatory mediators on middle ear mucosa. A method for measuring permeability and swelling. *Arch Otolaryngol.* 1976;102(7):420-4.
90. Boisvert P, Wasserman SI, Schiff M, Ryan AF. Histamine-induced middle ear effusion and mucosal histopathology in the guinea pig. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1985;94:212-6.
91. Goldie P, Hellstrom S, Idahl LA. Middle ear effusion induced by various inflammatory mediators and neuropeptides. An experimental study in the rat. *Acta Otolaryngol.* 1989;108(3-4):246-52.

92. Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor. *J Biol Chem.* 1990;265(29):17381-4.
93. Hayashi H, Kudo I, Inoue K, Onozaki K, Tsushima S, Nomura H, et al. Activation of guinea pig peritoneal macrophages by platelet activating factor (PAF) and its agonists. *J Biochem.* 1985;97(6):1737-45.
94. Tsuji H, Furukawa M, Ikeda H, Asako M, Yamashita T. The presence of platelet-activating factor-acetylhydrolase in human middle ear effusions. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 1998;60(1):25-9.
95. Hirose K, Li SZ, Ohlemiller KK, Ransohoff RM. Systemic lipopolysaccharide induces cochlear inflammation and exacerbates the synergistic ototoxicity of kanamycin and furosemide. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2014;15:555-70.
96. Quintanilla-Dieck L, Larrain B, Trune D, Steyger PS. Effect of systemic lipopolysaccharide-induced inflammation on cytokine levels in the murine cochlea: a pilot study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;149:301-3.
97. Zhang J, Chen S, Hou Z, Cai J, Dong M, Shi X. Lipopolysaccharide-induced middle ear inflammation disrupts the cochlear intra-strial fluid-blood barrier through down-regulation of tight junction proteins. *PLoS One.* 2015;10(3):e0122572. (Citirano 13.10.2019.). Dostupno na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122572>
98. Gratton MA, Schmiedt RA, Schulte BA. Age-related decreases in endocochlear potential are associated with vascular abnormalities in the stria vascularis. *Hear Res.* 1996;102: 181-90.
99. Ohlemiller KK, Rice ME, Gagnon PM. Strial microvascular pathology and age associated endocochlear potential decline in NOD congenic mice. *Hear Res.* 2008;244:85-97.
100. Salt AN, Melichar I, Thalmann R. Mechanisms of endocochlear potential generation by stria vascularis. *Laryngoscope.* 1987;97:984-91.
101. Wangemann P. Cochlear blood flow regulation In: Arnold W, editor. Rational Pharmacotherapy of the Inner Ear. München/Wildbad Kreuth: Karger;2002:51-7.
102. Alves AL, Ribeiro FAQ. O papel das citocinas no colesteatoma adquirido da orelha média: revisão da literatura. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004;70(6):813-8.
103. Bingham CO. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Reumatol Suppl.* 2002;65:3-9.
104. Kreutzer DL, Yellon RF, Leonard G, Marucha PT, Craven R, Carpenter RJ, et al. Characterization of cytokines present in middle ear effusions. *Laryngoscope.* 1991; 101:165-9.
105. Yan SD, Huang CC. The role of tumor necrosis factor-alpha in bone reabsorption of cholesteatoma. *Am J Otolaryngol.* 1991;12:83-9.
106. Iino K, Toryama M, Ogawa H, Kawakami M. Cholesteatoma debris as an activator of human monocytes. *Acta Otolaryngol.* 1990;110:410-5.
107. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Citocinas. In: Imunologia celular e molecular. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Revinter 1998:253-76.
108. Yong-Soo P, Sang WY, Young CC, Timothy TKJ. Effect of inhibitor of tumor necrosis factor-alpha on experimental otitis media with effusion. *Ann Otol Laryngol.* 2001;110: 917-21.

109. Yetiser S, Satar B, Aydin N. Expression of epidermal growth factor, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1alpha in chronic otitis media with or without cholesteatoma. *Otol Neurotol*. 2002; 23(5):647-52.
110. Marenda SA, Aufdemorte TB. Localization of cytokines in cholesteatoma tissue. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995;112(3):359-68.
111. Amar MS, Wishahi HF, Zakhary MM. Clinical and biochemical studies of bone destruction in cholesteatoma. *J Laryngol Otol*. 1996;110(6):534-9.
112. Dretzke J, Edlin R, Round J, Connock M, Hulme C, Czeczot J, et al. A systematic review and economic evaluation of the use of tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) inhibitors, adalimumab and infliximab, for Crohn's disease. *Health Technol Assess*. 2011;15(6):1-244.
113. Akdis M, Burgler S, Crameri R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):701-21.
114. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2002;20(5 Suppl 27):S1-13.
115. Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin Exp Immunol*. 2007;149(2):217-25.
116. Cruse JM, Lewis RE. Cytokines and chemokines. In: Cruse JM, Lewis RE, editors. *Atlas of immunology*. 2nd ed. Boca Raton (FL):CRC Press LLC; 2004:285-319.
117. Kunkel SL, Chensue SW. Arachidonic acid metabolites regulate interleukin-1 production. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985;30;128(2):892-7.
118. Durum SK, Schmidt JA, Oppenheim JJ. Interleukin 1: an immunological perspective. *Annu Rev Immunol*. 1985;3:263-87.
119. Strober W, James SP. The interleukins. *Pediatr Res*. 1988;24(5):549-57.
120. Koltai M, Hosford D, Guinot P, Esanu A, Braquet P. Platelet activating factor (PAF). A review of its effects, antagonists and possible future clinical implications (Part I). *Drugs*. 1991;42(1):9-29.
121. Nawroth PP, Bank I, Handley D, Cassimeris J, Chess L, Stern D. Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. *J Exp Med*. 1986;163(6):1363-75.
122. Kilian PL, Kaffka KL, Stern AS, Woehle D, Benjamin WR, Dechiara TM, et al. Interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta bind to the same receptor on T cells. *J Immunol*. 1986;136(12):4509-14.
123. Kohase M, May LT, Tamm I, Vilcek J, Sehgal PB. A cytokine network in human diploid fibroblasts: interactions of beta-interferons, tumor necrosis factor, platelet-derived growth factor, and interleukin 1. *Mol Cell Biol*. 1987;7(1):273-80.
124. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, et al. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 1988;167(6):1883-93.
125. Staren ED, Essner R, Economou JS. Overview of biological response modifiers. *Semin Surg Oncol*. 1989;5(6):379-84.
126. Dinarello CA. Interleukin-1. *Dig Dis Sci*. 1988;33(3 Suppl):25S-35S.

127. Ghezzi P, Dinarello CA. IL-1 induces IL-1. III. Specific inhibition of IL-1 production by IFN-gamma. *J Immunol.* 1988;140(12):4238-44.
128. Kunkel SL , Chensue SW, Strieter RM, Lynch JP, Remick DG. Cellular and molecular aspects of granulomatous inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1989;1(6):439-47.
129. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 1990;346 (6283): 425-34.
130. Dinarello CA. Biology of interleukin 1. *FASEB J.* 1988;2(2):108-15.
131. Arend WP, Gordon DF, Wood WM, Janson RW, Joslin FG, Jameel S. IL-1 beta production in cultured human monocytes is regulated at multiple levels. *J Immunol.* 1989;143(1):118-26.
132. Goeken NE, Staggs TS, Ballas ZK. Monocyte suppressor factor is plasminogen activator inhibitor inhibition of membrane bound but not soluble IL-1. *J Immunol.* 1989;143(2):603-8.
133. Nell MJ, Grote JJ. Endotoxin and tumor necrosis factor-alpha in middle ear effusions in relation to upper airway infection. *Laryngoscope.* 1999;109(11):1815-9.
134. Bikhazi P, Ryan AF. Expression of immunoregulatory cytokines during acute and chronic middle ear immune response. *Laryngoscope.* 1995;105(6):629-34.
135. Gowen M, Mundy GR. Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon-gamma on bone resorption in vitro. *J Immunol.* 1986;136(7):2478-82.
136. Schilling V, Negri B, Bujía J, Schulz P, Kastenbauer E. Possible role of interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta in the pathogenesis of cholesteatoma of the middle ear. *Am J Otol.* 1992;13(4):350-5.
137. Britze A, Palmfeldt J, Gregersen N, Ovesen T. 44 plex cytokine profile of cholesteatoma. *Acta Otolaryngol* 2014; 134(1):41-50.
138. Miyasato M, Takeno S, Hirakawa K. Expression of RANKL and proliferation abilities of cultured human middle ear cholesteatoma epithelial cells. *Hiroshima J Med Sci.* 2013;62(1):1-6.
139. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodont Res.* 1993;28:500-10.
140. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;147:1-73.
141. Kucukguven A, Khalil RA. Matrix metalloproteinases as potential targets in the venous dilation associated with varicose veins. *Curr Drug Targets.* 2013;14(3):287-324.
142. English WR, Holtz B, Vogt G, Knauper V, Murphy G. Characterization of the role of the "MTloop": an eight-amino acid insertion specific to progelatinase A (MMP2) activating membranetype matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(45):42018-26.
143. Pei D, Kang T, Qi H. Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. *J Biol Chem.* 2000; 275(43):33988-97.
144. Basset P, Okada A, Chenard MP, Cannan R, Stoll I, Anglard P, et al. Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutical implications. *Matrix Biol.* 1997;15:535-41.
145. Murphy G, Knauper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol.* 1997;15:511-18.

146. Nam SI, Kwon TK. Dexamethasone inhibits interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression in cochlear cells. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2014; 7(3):175-80.
147. Olszewska E, Matulka M, Mroczko B, Pryczynicz A, Kemona A, Szmitkowski M, et al. Diagnostic value of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 in cholesteatoma. *Histol Histopathol.* 2016; 31(3):307-15.
148. Schönermark M, Mester B, Kempf H-G, Bläser J, Tschesche H, Lenarz T. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in human cholesteatomas. *Acta Otolaryngol.* 1996;116:451-6.
149. Schmidt M, Grünsfelder P, Hoppe F. Induction of matrix metalloproteinases in keratinocytes by cholesteatoma debris and granulation tissue extracts. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2000;257(8):425-9.
150. Naim R, Sadick H, Schafer C, Hormann K. External auditory canal cholesteatoma: analysis of the integrity of the tissue structure. *Int J Mol Med.* 2004;14(4):601-4.
151. Erbek S, Erinanc H, Hizal E, Ozluoglu LN. Expression of disintegrin and metalloproteinase family proteins 10, 12 and 17 incholesteatoma. *J Laryngol Otol.* 2013; 127(2):153-8.
152. Rezende CE, Souto RP, Rapoport PB, Campos Ld, Generato MB. Cholesteatoma gene expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors by RT-PCR. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2012;78(3):116-21.
153. Bujia J, Holly A, Stammberger M, Sudhoff H. Angiogenesis in cholesteatoma of the middle ear. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 1996;47:187-92.
154. Chole RA, Faddis BT. Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128:1129-33.
155. Brook I. Role of anaerobic bacteria in chronic otitis media and cholesteatoma. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 1995;31:153-7.
156. Kim J, Bhattacharjee R, Dayyat E, Snow AB, Kheirandish-Gozal L, Goldman JL, et al. Increased cellular proliferation and inflammatory cytokines in tonsils derived from children with obstructive sleep apnea. *Pediatr Res.* 2009;66(4):423-8.
157. Passali D, Damiani V, Passàli GC, Passàli FM, Bellussi L. Recurrent and chronic inflammations of Waldeyer's ring in childhood: infectious, structural and immunological features. *International Congress Series* 2003;1257:239-52.
158. Todorović MM, Zvrko EZ. Immunoregulatory cytokines and chronic tonsillitis. *Bosn J Basic Med Sci.* 2013;13(4):230-6.
159. Komorowska A, Komorowski J, Banasik M, Lewkowicz P, Tchorzewski H. Cytokines locally produced by lymphocytes removed from the hypertrophic nasopharyngeal and palatine tonsils. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2005;69(7):937-41.
160. Shihada R, Brodsky A, Luntz M. Giant cholesteatoma of the temporal bone. *Isr Med Assoc J.* 2006;8(10):718-9.
161. Shohet JA, de Jong AL. The management of pediatric cholesteatoma. *Otolaryngol Clin North Am.* 2002;35(4):841-51.
162. Migirov L, Yakirevitch A, Kronenberg J. Mastoid subperiosteal abscess: a review of 51 cases. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2005;69(11):1529-33.

163. Bluestone CD, Klein JO. Intratemporal complications and sequelae of otitis media. In: Bluestone CD, Stool SE, Kenna MA, eds. *Pediatric otolaryngology*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1996:583-635.
164. Isaacson G. Diagnosis of pediatric cholesteatoma. *Pediatrics*. 2007;120(3):603-8.
165. Chang P, Kim S. Cholesteatoma-diagnosing the unsafe ear. *Aust Fam Physician*. 2008;37(8):631-8.
166. Rosenberg SI, Silverstein H, Willcox TO, Gordon MA. Endoscopy in otology and neurotology. *Am J Otol*. 1994;15:168-72.
167. Tai CF, Ho KY, Juan KH. Age and the prognosis of tympanoplasty type I. *Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih*. 1998;14:542-47.
168. Monsell EM. New and revised reporting guidelines from the Committee on Hearing and Equilibrium. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation, Inc. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995;113(3):176-78.
169. Attallah MS. Microbiology of chronic suppurative otitis media with cholesteatoma. *Saudi Med J*. 2000;21(10):924-7.
170. Ricciardiello F, Cavaliere M, Mesolella M, Iengo M. Notes on the microbiology of cholesteatoma: clinical findings and treatment. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2009;29(4):197-202.
171. Matiñó E, Venegas MP, Díez S, Pinart J. Antibiotic treatment in surgery for cholesteatoma. *An Otorrinolaringol Ibero Am*. 1999;26(5):445-55.
172. East DM. Atticotomy with reconstruction for limited cholesteatoma. *Clin Otolaryngology*. 1998;23:248-52.
173. Azevedo AF, Soares AB, Garchet HQ, Sousa NJ. Tympanomastoidectomy: Comparison between canal wall-down and canal wall-up techniques in surgery for chronic otitis media. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2013;17(3):242-5.
174. Stankovic M. Audiologic results of surgery for cholesteatoma: short- and long-term follow-up of influential factors. *Otol Neurotol*. 2008;29(7):933-40.
175. Stankovic M. Follow-up of cholesteatoma surgery: open versus closed tympanoplasty. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2007;69(5):299-05.
176. Vartiainen E, Vartiainen J. Findings in revision operations for failures after cholesteatoma surgery. *Am J Otol*. 1994;15(2):229-33.
177. Mercke U. Anatomic findings one year after combined approach tympanoplasty. *Am J Otol*. 1986;7(2):150-4.
178. Cook JA, Krishnan S, Fagan PA. Hearing results following modified radical versus canalup mastoidectomy. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1996;105(5):379-83.
179. Hidaka H, Ishida E, Kaku K, Nishikawa H, Kobayashi T. Congenital cholesteatoma of mastoid region manifesting as acute mastoiditis: case report and literature review. *J Laryngol Otol*. 2010;124:810-15.
180. Habesoglu TE, Balak N, Habesoglu M, Zemheri E, Isik N, Elmaci I, et al. Intracranial cholesteatoma - case report and critical review. *Clin Neuropathol*. 2009;28:440-44.
181. Sanna M, Agarwal M, Khrais T, et al. Modified Bondy's technique for epitympanic cholesteatoma. *Laryngoscope* 2003;113(12):2218-21.
182. Arsović N, Radulović R, Ješić S, Krejović-Trivić S, Stanković P, Đukić V. Hirurgija holesteatoma-hirurška tehnika i recidivi holesteatoma. *Acta chirurgica iugoslavica*. 2004;51(1):103-7.

183. Zini C, Bacciu S, Pasanisi E, Bortesi G. Pathogenesis and prevention of recurrent cholesteatoma following closed tympanoplasty. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 1991;45(1):43-9.
184. Palva T. The pathogenesis and treatment of cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.* 1990;109(5-6):323-30.
185. Khemani S, Singh A, Lingam RK, Kalan A. Imaging of postoperative middle ear cholesteatoma. *Clin Radiol.* 2011;66:760-7.
186. Belcadhi M, Chahed H, Mani R, Bouzouita K. Therapeutic approaches to complicated cholesteatoma of the external auditory canal: a case of associated facial paresis. *Ear Nose Throat J.* 2010;89:E1-6.
187. Roger G, Denoyelle F, Chauvin P, Schlegel-Stuhl N, Garabedian EN. Predictive risk factors of residual cholesteatoma in children: a study of 256 cases. *Am J Otol.* 1997;18:550-8.
188. Brodsky L. Modern assessment of tonsils and adenoids. *Pediatr Clinic N Am.* 1989;36:1551-69.
189. Wullstein H. Theory and practice of tympanoplasty. *Laryngoscope.* 1956; 66:1076-93.
190. Austin DF. Types and indications of staging. *Arch Otolaryngol.* 1969;89:235-42.
191. Yousuf M, Majumder K, Kamal A, Shumon A, Zaman Y. Clinical Study on Chronic Suppurative Otitis Media with Cholesteatoma. *Bangladesh Journal of Otorhinolaryngol.* 2011;17:42-7.
192. Nelson M, Roger G, Koltai PJ, Garabedian EN, Triglia JM, Roman S, et al. Congenital cholesteatoma: classification, management and outcome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128(1):810-4.
193. Sastry KV, Sharma SC, Mann SB, Ganguly NK, Panda NK. Aural cholesteatoma: role of tumor necrosis factor-alpha in bone destruction. *Am J Otol.* 1999;20(2):158-61.
194. Aquino JE, Cruz Filho NA, de Aquino JN. Epidemiology of middle ear and mastoid cholesteatomas: study of 1146 cases. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2011;77(3):341-7.
195. Lee HY, Park MS, Byun JY, Kim YI, Yeo SG. Expression of pattern recognition receptors in cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2014;271(2):245-53.
196. Sadé J, Konak S, Hinchcliffe R. Cholesteatoma and Mastoid Surgery. Proceedings of 2nd International Conference. Tel-Aviv, Israel. Kugler Publications; 1982;640.
197. Wu Y, Tang X, Shao W, Lu Y. Effect of CT manifestations of cholesteatoma on MMP-2, MMP-9 and IL-6 in the serum of patients. *Exp Ther Med.* 2019;17(6):4441-6.
198. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37.
199. Skotnicka B, Hassmann E. Cytokines in children with otitis media with effusion. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2000;257(6):323-6.
200. Maxwell K, Leonard G, Kreutzer DL. Cytokine expression in otitis media with effusion. Tumor necrosis factor soluble receptor. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;123(9):984-8.
201. Nell MJ, Grote JJ. Endotoxin and tumor necrosis factor-alpha in middle ear effusions in relation to upper airway infection. *Laryngoscope.* 1999;109(11):1815-9.
202. Xie M, Zhou L, Jin X. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in middle ear effusions. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* 1997;32(5):280-2.

203. Palva A, Karma P, Kärjä J. Cholesteatoma in children. *Arch Otolaryngol*. 103(2):74-7.
204. Belcadhi M, Chahed H, Mani R, Bouzouita K. Predictive Factors of Recurrence in Pediatric Cholesteatoma Surgery. *Mediterr J Oto*. 2008;4:118-24.
205. Djurhuus BD, Skytthe A, Christensen K, Faber CE. Cholesteatoma in Danish children - a national study of changes in the incidence rate over 34 years. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2015;79(2):127-30.
206. Morales DS, Penido N de O, da Silva ID, Stávale IN, Guilherme A, Fukuda Y. Matrix metalloproteinase 2: an important genetic marker for cholesteatomas. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2007;73(1):51-7.
207. Jennings BA, Prinsley P, Philpott C, Willis G, Bhutta MF. The genetics of cholesteatoma. A systematic review using narrative synthesis. *Clin Otolaryngol*. 2018;43:55-67.
208. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010;140:805-20.
209. Kuczkowski J, Sakowicz-Burkiewicz M, Iżycka-Świeszewska E, Mikaszewski B, Pawełczyk T. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-6 and interleukin-10 in chronic otitis media with bone osteolysis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2011;73(2):93-9.
210. Dornelles C, Hemb L, Schweiger C, Matter R, Smith M, Schimdt L, et al. Epidemiologia dos pacientes pediátricos do ambulatório de otite média crônica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (AOMC-HCPA). *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2004;71(4):536-46.
211. Deguine O, Deguine, CH. The contralateral ear in cholesteatoma. Cholesteatoma and mastoid surgery. 3rd International Conference of Cholesteatoma. Copenhagen, Kugler & Ghedine Publications, Amesterdam, Berkeley, Milano;1989;393-98.
212. Penido Nde O, Borin A, Iha LC, Suguri VM, Onishi E, Fukuda Y, et al. Intracranial complications of otitis media: 15 years of experience in 33 patients. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;132(1):37-42.
213. Bernal Sprekelsen M, Ebmeyer J, Anonopoulos A, Borkowski G, Sudhoff H. Alteraciones de la membrana basal en el colesteatoma de oido humano. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2001;52(4):330-5.
214. Orihara K, Nagata K, Hamasaki S, Oba R, Hirai H, Ishida S, et al. Time-course of Toll-like receptor 2 expression, as a predictor of recurrence in patients with bacterial infectious diseases. *Clin Exp Immunol*. 2007;148(2):260-70.
215. Barzilai A, Leibovitz E, Laver JH, Piglansky L, Raiz S, Abboud MR, et al. Dynamics of interleukin-1 production in middle ear fluid during acute otitis media treated with antibiotics. *Infection*. 1999;27(3):173-6.
216. Barzilai A, Dekel B, Dagan R, Passwell JH, Leibovitz E. Cytokine analysis of middle ear effusions during acute otitis media: significant reduction in tumor necrosis factor alpha concentrations correlates with bacterial eradication. *Pediatr Infect Dis J*. 1999;18(3):301-3.
217. Wilmoth JG, Schultz GS, Antonelli PJ. Tympanic Membrane Metalloproteinase Inflammatory Response. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2003;129(6):647-54.
218. Spandow O, Hellström S, Dahlström M. Structural characterization of persistent tympanic membrane perforations in man. *Laryngoscope*. 1996;106(3 Pt 1):346-52.

219. Santa Maria PL, Redmond SL, McInnes RL, Atlas MD, Ghassemifar R. Tympanic membrane wound healing in rats assessed by transcriptome profiling. *Laryngoscope*. 2011;121(10):2199-213.
220. Urík M, Hurník P, Žiak D, Machač J, Šlapák I, Motyka O, et al. Immunohistochemical analysis of retraction pocket pars tensa of tympanic membrane in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2019;122:111-6.
221. Sugita T, Huang CC, Abramson M. The effect of endotoxin and prostaglandin E2 on the proliferation of keratinocytes in vitro. *Arch Otorhinolaryngol* 1986;243(3): 211-4.
222. Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol*. 1993;101:64-8.
223. Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Rep Reg*. 1996;4:411-20.
224. Abramson M, Huang CC. Localization of collagenase in human middle ear cholesteatoma. *Laryngoscope*. 1976;86:771-91.
225. Thomsen J. Bone resorption in chronic otitis media. In: McCabe BF, Sadé, J, Abramson, M. eds. 1st International Conference on Cholesteatoma. Aesculapius Publishing Co.: Birmingham, ALA;1977:136.
226. Ruedi L. Cholesteatosis of attic. *Laryngol Otol*. 1958;73:593-609
227. Tumarkin A. Attic cholesteatoma. *J Laryngol Otol*. 1958;72:610-9.
228. Thomsen J, Jorgensen B, Bretlau P, Kristensen HK. Bone resorption in chronic otitis media. A histological and ultrastructural study. I. Ossicular necrosis. *J Laryngol Otol*. 1974;88:975-82.
229. Sadé J, Berco E. Bone destruction in chronic otitis media. A histopathological study. *J Laryngol Otol*. 1974;88:413-22.
230. Kranc SM, Dayer JM, Goldring SR. Ossicular pathology In: McCabe BF, Sadé J, Abramson M. Cholesteatoma 1st International Conference. Birmingham: Aesculapius; 1977:102-10.
231. 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;62:257-65.
232. Li Z, Li X, Liu G. A study on expression of tumor necrosis factor alpha in middle ear cholesteatoma and its effect on bone destruction. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 2001;15(2):66-7.
233. Suchozebska-Jesionek D, Szymański M, Kurzepa J, Gołabek W, Stryjecka-Zimmer M. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 in middle ear cholesteatoma. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;37(5):628-32.
234. Wang L, Zhang ZG, Zhang RL, Gregg SR, Hozeska-Solgot A, LeTourneau Y. Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 Secreted by Erythropoietin-Activated Endothelial Cells Promote Neural Progenitor Cell Migration. *J Neurosci*. 2006;26(22): 5996-6003.
235. Tos M. Pathology of the ossicular chain in various chronic middle ear diseases. *J Laryngol Otol*. 1979;93:769-80.

236. Palomar V, Fortuny JC. Données statistiques du cholestéatoma. Cahiers ORL. 1989;6(15):439-43.
237. Chole RA. The molecular biology of bone resorption due to chronic otitis media. Ann N Y Acad Sci. 1997;830:95-109.
238. Swartz JD. Cholesteatomas of the middle ear. Diagnosis Etiology and Complications. Radiol Clin North Am. 1984;22:15-34.
239. Kim CS, Lee CH, Chung JW, Kim CD. Interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interleukin-8 gene expression in human aural cholesteatomas. Acta Otolaryngol. 1996;116:302-6.
240. Monsell EM, Harley RE. Eustachian tube dysfunction. Otolaryngol Clin North Am. 1996;29:437-44.
241. Wolfman DE, Chole RA. Experimental retraction pocket cholesteatoma. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1986;95:639-44.
242. Maeda K, Hirano T, Ichimiya I, Kurono Y, Suzuki M, Mogi G. Cytokine expression in experimental chronic otitis media with effusion in mice. Laryngoscope. 2004;114(11):1967-72.
243. Chung JW, Yoon TH. Different production of interleukin-1alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 from cholesteatomatous and normal epithelium. Acta Otolaryngol. 1998;118(3):386-91.
244. Zhu W, Xie Y, Wang P. Expression of matrix metalloproteinase -2, -9 in cholesteatoma and middle ear cancer. Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi. 2001;36(2):119-22.
245. Banerjee AR, James R and Narula AA: Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in cholesteatoma and deep meatal skin. Clin Otolaryngol Allied Sci. 1998;23:345-7.
246. Nason R, Jung JY, Chole RA: Lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis from mononuclear precursors: a mechanism for osteolysis in chronic otitis. J Assoc Res Otolaryngol. 2009;10:151-60.
247. Ahmed M, Mohammed S. Metalloproteinases 2 and 9 in situ mRNA expression in colorectal tumors from Iraqi patients. Indian Journal Pathology & Microbiology. 2011;54(1):7-14.
248. Nason R, Jung JY, Chole RA: Lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis from mononuclear precursors: a mechanism for osteolysis in chronic otitis. J Assoc Res Otolaryngol. 2009;10:151-60.
249. Yuehua Q, Longzhen Z, Kailin X, Lingyu Z, Lingjian M, Jun W, et al. Inflammatory lesions of cochlea in murine cytomegalovirus-infected mice with hearing loss. Cell Biochem Biophys. 2012;62(2):281-7.
250. MacArthur CJ, Pillers DA, Pang J, Kempton JB, Trune DR. Altered expression of middle and inner ear cytokines in mouse otitis media. Laryngoscope. 2011;121(2):365-71.
251. Ghaheri BA, Kempton JB, Pillers DA, Trune DR. Cochlear cytokine gene expression in murine chronic otitis media. Otolaryngol Head Neck Surg. 2007;137(2):332-7.
252. Harabuchi Y, Takahara M. Recent advances in the immunological understanding of association between tonsil and immunoglobulin A nephropathy as a tonsil-induced autoimmune/inflammatory syndrome. Immun Inflamm Dis. 2019;7(2):86-93.

253. Hoefakker S, van 't Erve EH, Deen C, van den Eertwegh AJ, Boersma WJ, Notten WR, et al. Immunohistochemical detection of co-localizing cytokine and antibody producing cells in the extrafollicular area of human palatine tonsils. *Clin Exp Immunol.* 1993;93(2):223-8.
254. Andersson J, Abrams J, Bjork L, Funa K, Litton M, Agren K, et al. Concomitant *in vivo* production of 19 different cytokines in human tonsils. *Immunology.* 1994;83:16-24.
255. Kim J, Bhattacharjee R, Dayyat E, Snow AB, Kheirandish-Gozal L, Goldman JL, et al. Increased cellular proliferation and inflammatory cytokines in tonsils derived from children with obstructive sleep apnea. *Pediatr Res.* 2009;66(4):423-8.

## 9. PRILOZI

### Spisak skraćenih naziva u tekstu:

<b>TNF-α</b>	Faktor nekroze tumora-alfa (eng. <i>Tumor necrosis factor alpha</i> )
<b>IL-1</b>	Interleukin-1 (eng. <i>Interleukin 1</i> )
<b>MMP-9</b>	Matriks metaloproteinaza-9 (eng. <i>Matrix metalloproteinase-9</i> )
<b>COM</b>	Hronična upala srednjeg uha (eng. <i>Chronic otitis media</i> )
<b>EAONO/JOS</b>	Evropska akademija za otologiju i neurootologiju/Japansko otološko udruženje (eng. <i>The European Academy of Otology and Neurootology/Japan Otological Society</i> )
<b>HE</b>	Hematoksilin-eozin
<b>CK16</b>	Citokeratin 16 (eng. <i>Cytokeratin 16</i> )
<b>Ki-67</b>	Nuklearni protein povezan s ćelijskom proliferacijom (eng. <i>Nuclear protein that is associated with cellular proliferation</i> )
<b>PCNA</b>	Proliferirajući ćelijski nuklearni antigen (eng. <i>Proliferating cell nuclear antigen</i> )
<b>AgNORs</b>	Argirofilna regija nuklearnih organizatora (eng. <i>Argyrophilic nucleolar organizer regions</i> )
<b>EGF</b>	Epidermalni faktor rasta (eng. <i>Epidermal growth factor</i> )
<b>EGFR</b>	Receptor epidermalnog faktora rasta (eng. <i>Epidermal growth factor receptor</i> )
<b>TGF</b>	Transformišući faktor rasta (eng. <i>Transforming growth factor</i> )
<b>GJIC</b>	Intercelularna komunikacija pukotinastom vezom (eng. <i>Gap junction intercellular communication</i> )
<b>GJB2</b>	Beta 2 protein pukotinastih veza (eng. <i>Gap junction beta-2 protein</i> )
<b>ICAM-1</b>	Intercelularni adhezivni molekul 1 (eng. <i>Intercellular adhesion molecule 1</i> )
<b>VCAM-1</b>	Adhezioni molekul vaskularne ćelije 1 (eng. <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> )
<b>RANKL</b>	Ekspresija receptora aktivatora nuklearnog faktora <i>kappa B</i> i njegovog liganda (eng. <i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i> )
<b>PAF</b>	Faktor aktivacije trombocita (eng. <i>Platelet-activating factor</i> )
<b>PTHrP</b>	Peptid sličan paratiroidnom hormonu (eng. <i>Parathyroid hormone-related peptide</i> )
<b>KGF</b>	Faktor rasta keratinocita (eng. <i>Keratinocytes growth factor</i> )
<b>GM-CSF</b>	Faktor koji stimuliše koloniju granulocita i makrofaga (eng. <i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> )

<b>PDGF</b>	Faktor rasta porijeklom iz trombocita (eng. <i>Platelet-derived growth factor</i> )
<b>LPS</b>	Lipopolisaharidi (eng. <i>Lipopolysaccharides</i> )
<b>TNF-R1</b>	Receptor faktora nekroze tumora 1 (eng. <i>Tumor necrosis factor receptor 1</i> )
<b>TNF-R2</b>	Receptor faktora nekroze tumora 2 (eng. <i>Tumor necrosis factor receptor 1</i> )
<b>TIMP</b>	Tkvni inhibitor metaloproteinaza (eng. <i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i> )
<b>CD3</b>	Klaster diferencijacije 3 (eng. <i>Cluster of differentiation 3</i> )
<b>VEGF</b>	Vaskularni endotelni faktor rasta (eng. <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
<b>HLA-II</b>	Humani histokompatibilni antigen (eng. <i>Human histocompatibility antigen</i> )
<b>IFN-γ</b>	Interferon gama (eng. <i>Interferon gamma</i> )
<b>Th1</b>	T pomoćne ćelije tipa 1 celularnog imunog odgovora (eng. <i>T helper cells</i> )
<b>KT</b>	Kompjuterizovana tomografija (eng. <i>Computed tomography</i> )
<b>MR</b>	Magnetna rezonanca (eng. <i>Magnetic resonance</i> )
<b>PTA</b>	Prosječni prag sluha (eng. <i>Pure tone average</i> )
<b>ABG</b>	Vazdušno-koštana pukotina/zjap (eng. <i>Air-bone gap</i> )
<b>CWU</b>	Očuvan zadnji zid zvukovoda (eng. <i>Canal wall-up</i> )
<b>CWD</b>	Uklonjen zadnji zid zvukovoda (eng. <i>Canal wall-down</i> )
<b>TLRs</b>	Receptori molekularnih uzoraka (eng. <i>Toll-like receptors</i> )
<b>NLRs</b>	Receptori slični NOD-u (eng. <i>Nucleotide-binding oligomerization domain like receptors</i> )
<b>mRNA</b>	Informaciona ribonukleinska kiselina (eng. <i>Messenger ribonucleic acid</i> )
<b>PRR</b>	Receptor prepoznavanja paterna (eng. <i>Pattern recognition receptor</i> )
<b>CNS</b>	Koagulaza negativni Stafilocokus (eng. <i>Coagulase-negative Staphylococcus</i> )
<b>bFGF</b>	Osnovni faktor rasta fibroblasta (eng. <i>Basic fibroblast growth factor</i> )
<b>sTNF RI</b>	Rekombinantni humani TNF receptor tip I (eng. <i>Recombinant Human soluble TNF receptor Type I</i> )
<b>BMP</b>	Koštani morfogenetski protein (eng. <i>Bone morphogenetic protein</i> )
<b>FGF</b>	Faktor rasta fibroblasta (eng. <i>Fibroblast growth factor</i> )
<b>VEGF</b>	Vaskularni endotelni faktor rasta (eng. <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
<b>RT-PCR</b>	Lančana reakcija polimeraze reverznom transkriptazom (eng. <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
<b>TIMP1</b>	Tkvni inhibitor metaloproteinaza 1 (eng. <i>Tissue inhibitor of metalloproteinases 1</i> )
<b>IDCs</b>	Interdigitirajuće dendritske ćelije (eng. <i>Interdigitating dendritic cells</i> )

## BIOGRAFIJA

Dalibor Vranješ je rođen 25.12.1970. godine u Banjoj Luci gdje je završio Osnovnu školu i Gimnaziju. Diplomirao je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 1997. godine. U periodu od 1997. do 1998. godine, obavio je ljekarski staž u Kliničko bolničkom centru "Zvezdara", Beograd. Stručni ispit pri Ministarstvu zdravlja, Vlada Republike Srbije, položio je 1998. godine. Specijalistički ispit iz Otorinolaringologije je položio 2006. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci. Od 1998. do 2001. godine zaposlen u Služba hitne medicinske pomoći, Dom zdravlja, Banjaluka na radnom mjestu doktora medicine. Od 2001. godine zaposlen u Klinici za bolesti uha, grla i nosa, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske, Banjaluka u svojstvu ljekara na specijalizaciji iz otorinolaringologije, a od 2006. godine ljekara specijaliste otorinolaringologije. Postdiplomski studij iz područja biomedicinskih istraživanja na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci, sproveo je u periodu od 2004. do 2008. godine. Odbranio je 2013. godine magistarski rad pod nazivom: "*Uticaj i povezanost pojedinih faktora rizika za nastanak akutne upale srednjeg uha u dječjem uzrastu*" na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci iz uže naučne oblasti otorinolaringologija. Od 2015. godine do danas, anagažovan u svojstvu Višeg asistenta na Katedri za otorinolaringologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci. Rješenjem Ministarstva pravde, Vlada Republike Srpske, od 2010. godine, imenovan za stalnog sudskog vještaka medicinske struke iz oblasti otorinolaringologije. Aktivno učestvovao u više navrata na Instrukcionim kursevima iz disekcije temporalne kosti i mikrohirurgije srednjeg uha na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu. Kliničku edukaciju iz oblasti otologije i otohirurgije sproveo u više navrata u Univerzitetskoj kliničkoj bolnici u Linköping-u i Štokholmu, Švedska i Klinici za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju, Beograd. U svojstvu saradnika je učestvovao u realizaciji više nacionalnih naučno-istraživačkih projekata. Autor je i koautor preko 100 naučnih i stručnih radova iz otologije, otohirurgije, pedijatrijske otorinolaringologije i ostalih oblasti otorinolaringologije, koji su publikovani u nacionalnim i međunarodnim časopisima i prezentovani u sklopu radionica, simpozijuma i kongresa na nacionalnom i međunarodnom nivou. Aktivno govori engleski i služi se francuskim jezikom.

**Izjava 1**

**IZJAVA O AUTORSTVU**

**Izjavljujem  
da je doktorska disertacija**

**ZNAČAJ EKSPRESIJE MEDIJATORA INFLAMACIJE KOD  
HOLESTEATOMA SREDNJEG UHA**

**THE SIGNIFICANCE OF INFLAMMATORY MEDIATORS EXPRESSION  
IN MIDDLE EAR CHOLESTEATOMA**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da doktorska disertacija, u cijelini ili u dijelovima, nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Banjoj Luci, 07.12.2020. godine

Potpis doktoranta:

Danilo Vučić

**Izjava 2**

**Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci  
da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom**

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**ZNAČAJ EKSPRESIJE MEDIJATORA INFLAMACIJE  
KOD HOLESTEATOMA SREDNJEG UHA**

koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

Doktorsku disertaciju sa svim prilozima predao sam u elektronskom formatu pogodnim za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo-nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
- 4. Autorstvo - nekomercijalno - dijeliti pod istim uslovima**
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - dijeliti pod istim uslovima

U Banjoj Luci, 07.12.2020. godine

Potpis doktoranta:  
Domin Urošević

### Izjava 3

#### **Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije**

Ime i prezime autora: **Dalibor Vranješ**

Naslov rada: **Značaj ekspresije medijatora inflamacije kod  
holesteatoma srednjeg uha**

Mentor: **Prof. dr sc. med. Slobodan Spremo**

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije identična elektronskoj verziji koju sam predao za digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci, 07.12.2020. godine

Potpis doktoranta:

