

Małgorzata Potocka-Bakłażec

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Finansowana z grantu promotorskiego Jerzego Kuczkowskiego

nr N N401 002836

**Poziom ekspresji genów *IL-1*, *TNFα*, *OPG* a obecność wirusa odry  
w strzemiączkach chorych na otosklerozę**

Promotor: dr hab. med. Jerzy Kuczkowski

Praca wykonana w Katedrze i Klinice Otolaryngologii GUMed

Kierownik: prof. dr hab. med. Czesław Stankiewicz

oraz w Zakładzie Medycyny Molekularnej GUMed

Kierownik: prof. dr hab. med. Tadeusz Pawełczyk

Gdańsk 2011

*Składam najserdeczniejsze podziękowania promotorowi Panu dr hab. med. Jerzemu Kuczkowskiemu oraz Panu prof. dr hab. med. Czesławowi Stankiewiczowi za określenie tematyki pracy i pomoc w trakcie jej realizacji.*

*Wyrażam serdeczne podziękowania Panu prof. dr hab. med. Tadeuszowi Pawełczykowi za możliwość wykonywania badań w Zakładzie Medycyny Molekularnej.*

*Szczególne podziękowania składam Pani dr n. med. Monice Sakowicz-Burkiewicz za nieocenioną pomoc, bez której realizacja tej pracy nie byłaby możliwa.*

*Mężowi Marcinowi i Rodzicom dziękuję za okazaną cierpliwość i wyrozumiałość.*

## **Objaśnienie stosowanych skrótów i symboli**

**AT** audiogram tonalny

**β-aktyna** beta-aktyna

**cDNA** komplementarny DNA

**DNA** kwas deoksyrybonukleinowy

**dB** decybel

**GAPDH** *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

**HL** *hearing loss*, ubytek słuchu

**HR-TK** *high resolution computed tomography*, tomografia komputerowa o wysokiej rozdzielczości

**IL-1** interleukina 1

**komórki NK** *Natural Killer*, limfocyty, komórki układu immunologicznego

**mRNA** *messenger RNA*, RNA matrycowy, informacyjny

**OPG** osteoprotegeryna

**PCR** *Polymerase Chain Reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy

**Real-time PCR** *Real time Polymerase Chain Reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym, PCR w czasie rzeczywistym

**RT-PCR** *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy poprzedzona odwrotną transkrypcją

**RNA** kwas rybonukleinowy

**RNaza** rybonukleaza

**TK** tomografia komputerowa

**TNFα** *tumor necrosis factor α*, czynnik martwicy nowotworów α

## SPIS TREŚCI

Wykaz i objaśnienie stosowanych skrótów i symboli.....	3
Spis treści.....	4
1. Wstęp.....	7
1.1 Rys historyczny badań nad otoskleroza.....	7
1.2 Epidemiologia otosklerozy.....	8
1.3 Etiologia i patogenez otosklerozy.....	9
1.4 Obraz histopatologiczny i podział otosklerozy.....	13
1.5 Objawy, diagnostyka i leczenie otosklerozy.....	15
2. Cel pracy.....	19
3. Materiał i Metody.....	20
3.1 Materiał badań.....	20
3.2 Kwalifikacja chorych do badania.....	20
3.3 Dane epidemiologiczno-kliniczne.....	21
3.4 Badania słuchu.....	21
3.4.1 Próby stroikowe.....	21
3.4.2 Audiometria tonalna.....	21
3.4.3 Audiometria impedancyjna.....	22
3.5 Skala unieruchomienia strzemiączka.....	22
3.6 Materiał do badań molekularnych.....	23
3.7 Metody badań molekularnych .....	24
3.7.1 Izolacja całkowitego RNA z tkanek.....	24
3.7.2 Ocena ilości transkryptu badanych genów za pomocą reakcji .....	24

łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time PCR).....	5
3.7.3 Wykrywanie RNA wirusa odry.....	27
3.8 Analiza statystyczna.....	28
4. Wyniki.....	31
4.1 Charakterystyka epidemiologiczno-kliniczna.....	31
4.2 Objawy otologiczne.....	33
4.3 Wyniki badań audiologicznych.....	34
4.3.1 Wyniki audiometrii tonalnej.....	34
4.3.2 Stopień zaawansowania procesu otosklerotycznego.....	38
4.3.3 Wyniki audiometrii impedancyjnej.....	39
4.3.4 Próby stroikowe.....	39
4.3.5 Poziom głębokości niedosłuchu i stopień zaawansowania procesu otosklerotycznego zależnie od zmiennych dodatkowych.....	41
4.4 Wyniki badań molekularnych.....	42
4.4.1 Obecność RNA wirusa odry w badanym materiale.....	42
4.4.2 Związek między obecnością RNA wirusa odry a obecnością mRNA: <i>TNF<math>\alpha</math></i> , <i>IL-1</i> i <i>OPG</i> .....	43
4.4.3 Poziom ekspresji genów: <i>TNF<math>\alpha</math></i> , <i>IL-1</i> , <i>OPG</i> zależnie od grupy.....	45
4.4.4 Związek między poziomem ekspresji genów: <i>TNF<math>\alpha</math></i> , <i>IL-1</i> i <i>OPG</i> w próbkach odropozytywnych.....	46
4.4.5 Poziom ekspresji genów: <i>OPG</i> , <i>TNF<math>\alpha</math></i> i <i>IL-1</i> w próbkach	47

odropozytywnych                      zależnie                      od                      czasu                      trwania	
choroby.....	
4.4.6 Związek między obecnością RNA wirusa odry, poziomem	
ekspresji genów <i>TNFα</i> i <i>IL-1</i> a poziomem ekspresji genu <i>OPG</i> .....	49
4.5 Związek między przebytą odrą i szczepieniem a obecnością RNA	
wirusa odry w strzemiączkach.....	50
5. Omówienie.....	53
6. Wnioski.....	72
7. Streszczenie.....	73
8. Summary.....	76
9. Piśmiennictwo.....	78
10. Spis rycin.....	94
11. Spis tabel.....	95
12. Aneks.....	97

## 1.WSTĘP

Utrata słuchu u ludzi powoduje znaczne upośledzenie jakości życia i nierzadko prowadzi do izolacji społecznej. Jedną z częstszych przyczyn nabytego niedosłuchu jest otoskleroza, choroba często spotykana w praktyce zarówno otolaryngologa jak i lekarza podstawowej opieki zdrowotnej. Niewyjaśniona etiologia otosklerozy wzbudza szerokie zainteresowanie badaczy na całym świecie.

### 1.1 Rys historyczny badań nad otosklerozą

W 1704 roku podczas sekcji chorego z głuchotą włoski chirurg i anatom Antonio Maria Valsalva odkrył, że unieruchomienie (ankyloza) podstawy strzemiączka spowodowane jest kostnieniem więzadła pierścieniowego. Termin otoskleroza wprowadził w 1869 roku niemiecki otolog Anton Friedrich von Tröltsch, opisując ostateczną nieaktywną fazę przebudowy kostnej błędnika [1, 2].

Pionierem badań nad otosklerożą był Adam Politzer. Stwierdził on, że jest to pierwotna choroba otoczki kostnej błędnika, a nie - jak powszechnie sądzono - zapalenie błony śluzowej ucha środkowego (1893 r.). Politzer jako pierwszy przedstawił opis histologiczny otosklerozy. W podręczniku „*Der Ohrenheilkunde Für Praktische Ärzte Und Studierende*” poświęcił tej chorobie oddzielny rozdział wskazując na jej znaczenie w powstawaniu niedosłuchu [3].

Friedrich Siebenmann (1912 r.) wprowadził termin otospongioza, określając tak fazę aktywną tej choroby [4].

Pierwszym otologiem, który usunął strzemiączko (stapedektomia) w celu poprawy słuchu był Johannes Kessel (1878 r.) [5, 6]. Po początkowej fali entuzjazmu

wywołanego wprowadzeniem nowej metody leczenia tej choroby, na początku XX Politzer i Siebenmann uznali te zabiegi za niepotrzebne a wręcz szkodliwe. Następnym etapem leczenia tej choroby był zabieg fenestracji na kanale półkolistym bocznym, wprowadzone przez Georga J. Jenkinsa w 1913 r. a rozpowszechnione przez Gunnara Holmgrena, Johna Housa i Juliusa Lemperta w latach dwudziestych i trzydziestych XX wieku [5].

Samuel Rosen (1953 r.) wprowadził metodę mobilizacji strzemiączka, która prowadziła do poprawy słuchu. W 1955 roku John J. Shea pierwszy wykonał stapedektomię z położeniem przeszczepu ściany żyłnej na okienko owalne i ustawieniem na nim protezki nylonowej zawieszanej na odnodze długiej kowadełka. W 1960 roku John Hough wprowadził metodę częściowej stapedektomii. Metody J. Shea i J. Hougha z modyfikacjami są stosowane obecnie przez chirurgów strzemiączka na całym świecie [5, 6, 7].

## **1.2 Epidemiologia otosklerozy**

Choroba ta występuje wyłącznie u ludzi, stanowi przyczynę od 5 do 9% wszystkich niedosłuchów w tym od 18 do 22% niedosłuchów przewodzeniowych. U około 10% chorych z otosklerozą rozwija się niedosłuch czuciowo-nerwowy [8, 9, 10]. U rasy białej chorzy na otosklerozę stanowią 0,3-0,4% populacji [8, 11-14], podczas gdy u rasy czarnej choroba ta występuje 10 razy rzadziej [15]. W populacji azjatyckiej jej rozpowszechnienie jest o wiele niższe niż w populacji kaukaskiej [16, 17]. Jest ona przyczyną 1,12% niedosłuchów u Japończyków [17, cyt. wg 18]. Niestety brak jest dokładnych danych epidemiologicznych tej choroby w Polsce [9]. Kobiety chorują na otosklerozę dwa razy częściej [1, 8, 11-13, 19, 20]. Według danych z piśmiennictwa, u



30-60% kobiet z otoskleroza, które były przynajmniej raz w ciąży, występuje pogorszenie słuchu [21, 22, cyt. wg 23, 24]. Lippy i wsp. przeprowadzili badania na temat wpływu ciąży na rozwój kliniczny otosklerozy. Porównali słuch kobiet, które rodziły ze słuchem kobiet, które nie rodziły. Badania te jednak nie potwierdziły wpływu ciąży na pogłębienie niedosłuchu [21, cyt. wg 25]. Pierwsze objawy choroby ujawniają się najczęściej w trzeciej dekadzie życia [12, 26]. Istnieją również doniesienia o występowaniu otosklerozy u dzieci [27, cyt. wg 28, 29-32].

### **1.3 Etiologia i patogeneza otosklerozy**

Jednoznacznej przyczyny powstania otosklerozy do tej pory nie ustalono. Według obecnego stanu wiedzy, u podłoża tej choroby stoją współdziałające czynniki środowiskowe oraz genetyczne [11, 33]. Obok nich do najważniejszych przyczyn tego schorzenia zalicza się zaburzenia hormonalne, immunologiczne, enzymatyczne oraz infekcje wirusowe [15, 21, 26, 34, 35]. Dowody na wirusowe podłoże choroby Pageta [cyt. wg 36, cyt. wg 37] oraz podobieństwo obrazu histologicznego do otosklerozy, pozwalają na przyjęcie hipotezy o etiologii wirusowej otosklerozy. Wśród podobieństw obu chorób można ponadto wyróżnić:

- przedłużający się subkliniczny przebieg,
- aktywność choroby trwająca latami,
- nieobecność ostrego zapalenia ucha,
- rodzinne predyspozycje,
- zajęty pojedynczy organ,
- obecność komórek olbrzymich w ognisku chorobowym,
- zwiększony obrót kostny,

– podwyższony poziom kwaśnej i alkalicznej fosfatazy w aktywnych ogniskach choroby oraz obecność w nich struktur wirusa [38].

Struktury podobne do nukleokapsydów paramyksowirusa w osteoklastach pacjentów z chorobą Pageta zaobserwowali w mikroskopie elektronowym Mills i Singer [cyt. wg 39]. W badaniach immunohistochemicznych potwierdzili oni obecność wirusa z rodziny *Paramyxoviridae* w zajętej kości [cyt. wg 40]. Doniesienia te i analogia zmian morfologicznych w otosklerozie i w chorobie Pageta skłoniły badaczy do poszukiwań wirusa w tkance otosklerotycznej. McKenna i wsp. w 1986 roku opisali po raz pierwszy struktury przypominające nukleokapsydy wirusa odry w osteoblastach i preosteoblastach tkanki otosklerotycznej [34, cyt. wg 41]. W następnych badaniach badacze ci znaleźli gen kodujący białko nukleokapsydu tego wirusa w 8 na 11 płytek strzemiączka pobranych z kości skroniowych od zmarłych z histologicznie potwierdzoną otosklerozą. Odkrycia tego dokonali przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *Polymerase chain reaction*, PCR) poprzedzonej odwrotną transkrypcją (ang. *Reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR) [cyt. wg 38]. Stosując tę metodę, Niedermeyer i wsp. również wykryli produkty amplifikacji specyficzne dla patogenu odry w 93% płytek strzemiączka pobranych od chorych na otosklerozę. U części tych pacjentów wykryli przeciwciała IgG przeciwko wirusowi odry również w przychłonce [42, cyt. wg 43]. Jednak nie wszystkim badaczom wykorzystującym metodę PCR udało się znaleźć RNA wirusa [44]. Bozorg Grayeli i wsp. wykorzystując metody immunofluorescencji, hodowli komórkowej oraz RT-PCR nie odnotowali obecności RNA wirusa odry w strzemiączkach chorych na otosklerozę [cyt. wg 45].

Wirus odry należy do rodziny *Paramyxoviridae*, rodzaju *Morbillivirus*. Jest

wirusem RNA składającym się z pojedynczej nici ujemnie spolaryzowanej a jego genom zbudowany jest z 15,894 nukleotydów (nt), zawiera 6 genów kodujących białka [46-49], (ryc. 1).

	Gen nukleo- kapsydu		Gen białka fosforylo- wanego		Gen białka korowe- go		Gen białka osłonki		Gen białka receptoro- wego		Gen RNA zależnej polimerazy RNA	
	<b>N</b>		<b>P</b>		<b>M</b>		<b>F</b>		<b>H</b>		<b>L</b>	

Ryc.1. Genom wirusa odry

Patogen ten rozprzestrzenia się drogą kropelkową i wnika do organizmu gospodarza poprzez drogi oddechowe. Jego replikacja następuje w nabłonku tchawicy i oskrzeli, a jego cząsteczki przenoszą się do węzłów chłonnych, skąd dalej w limfocytach i monocytach poprzez krew docierają do innych organów. Klasycznie odra – choroba wywołana tym wirusem - rozwija się po inkubacji trwającej 10-14 dni. Po okresie latencji występują: gorączka, katar, kaszel, zapalenie spojówek oraz charakterystyczna wysypka na skórze całego ciała. Wyzdrowienie niesie za sobą dożywotnią odporność na reinfekcję. Wynikiem interakcji pomiędzy cząsteczkami wirusa odry a organizmem gospodarza są różne postacie zachorowania na odrę i różne formy odpowiedzi immunologicznej. Przebieg infekcji zależy od stanu immunologicznego chorego [47, 49-52]. Przypuszcza się, że najważniejszym czynnikiem odgrywającym rolę w patogenezie otosklerozy jest wtórna odpowiedź immunologiczna wywołana przewlekłą stymulacją antygenową wirusem odry. Patogen odry może indukować wtórną reakcję autoimmunologiczną z odpowiedzią komórkową komórek NK (ang. *natural killer*, limfocyty), komórek cytotoksycznych aktywowanych przez limfokiny, komórek CD8<sup>+</sup> i granulocytów. Ponadto w ognisku

otosklerotycznym zlokalizowane są makrofagi, komórki z ekspresją beta 2-mikroglobuliny oraz składnik komplementu C3 [42, 53, 54]. Według Chodynckiego ważną rolę w patogenezie otosklerozy mogą odgrywać makrofagi. W swoich badaniach wykazał w surowicy chorych na otosklerozę w porównaniu do surowicy osób z grupy kontrolnej podwyższony poziom czynnika martwicy nowotworów alfa (ang. *Tumor necrosis factor, TNFα*) i interleukiny-1 (IL-1) [cyt. wg 55].

TNFα jest cytokiną prozapalną, która odgrywa bardzo ważną rolę w procesie przebudowy kości. W odpowiedzi na zakażenie wirusami lub bakteriami, TNFα wydzielana jest przez aktywne monocyty, makrofagi, limfocyty B i T oraz osteoklasty [54, 56, 57]. Funkcje prozapalne tego czynnika to między innymi: wzmożenie ekspresji molekuł adhezyjnych nabłonka, stymulacja ekspresji cytokin, aktywacja neutrofili, stymulacja proliferacji fibroblastów oraz efekt antywirusowy zarówno przeciwko wirusom DNA jak i RNA. TNFα ponadto pełni istotną rolę w przemianie komórek prekursorowych w aktywne osteoklasty.

Interleukina 1 jest ważnym mediatorem stanu zapalnego a produkowana jest głównie przez aktywne makrofagi. Cytokina ta ma wiele komórek docelowych włącznie z fibroblastami, komórkami nabłonkowymi, dojrzałymi komórkami T, dojrzałymi komórkami B, monocytami i neutrofilami oraz osteoklastami (aktywuje pompę protonową, prowadząc do resorpcji kości) [57]. IL-1 odgrywa główną rolę w procesie resorpcji kości w wielu metabolicznych schorzeniach. TNFα i interleukina - 1 nazywane są czynnikami osteoklastogenezy [58].

Obecność TNFα w kości zmienionej otosklerotycznie wskazuje na czynność osteoklastów i stanu zapalnego [54]. Wzrost poziomu ekspresji jego genu skutkuje wzrostem aktywacji osteoklastów i resorpcji kości [54, 56].

Oprócz TNF $\alpha$  i IL-1 w zachowaniu homeostazy kostnej bierze udział również osteoprotegeryna (ang. *osteoprotegerin*, OPG), która należy do nadrodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów. Nazywana również TNFRSF11b (ang. *tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b*), jest glikoproteiną składającą się z 401 aminokwasów. Główną rolą tej cytokiny jest hamowanie resorpcji kości. Jej działanie polega na hamowaniu różnicowania i aktywacji osteoklastów oraz wywoływaniu ich apoptozy [56, 59-61]. Wysoki poziom OPG występuje w płucach, nerkach, jelitach, trzustce, śledzionie i sercu, a także w osteoblastach. W komórkach dendrytycznych i limfocytach wykazano wysoką ekspresję genu *osteoprotegeriny* [59, 60].

Zehnder i wsp. stwierdził wysoki poziom ekspresji genu *osteoprotegeriny* w przychłonce chorych na otosklerozę [cyt. wg 61].

Działanie TNF $\alpha$ , IL-1 oraz OPG przynosi odwrotne efekty w regulacji przebudowy kości. TNF $\alpha$  i IL-1 przyczyniają się do wzrostu resorpcji kości, a osteoprotegeryna z kolei hamuje jej niszczenie [61-63]. Obniżenie poziomu ekspresji transkryptu genu *osteoprotegeriny* w aktywnej fazie otosklerozy jest wtórną konsekwencją infekcji wirusem odry i wzrostu poziomu cytokin prozapalnych, głównie TNF $\alpha$  [42, 62]. Czynniki martwicy nowotworów prowadzi do obniżenia ekspresji genu *OPG*. Jego zwiększona produkcja hamuje ochronne działanie osteoprotegeriny w przebudowie otoczki kostnej błędnika. Zmniejszony poziom OPG skutkuje zwiększonym obrotem kostnym i resorpcją kości [56].

#### **1.4 Obraz histologiczny i podział otosklerozy**

Otoskleroza jest chorobą kości skroniowej, w przebiegu której normalną tkankę kostną zastępuje kość zmieniona (otosklerotyczna). Ogniska otosklerotyczne lokalizują

się najczęściej w miejscu zwanym *fissula ante fenestram*. Jest to szczelinka otoczona przez tkankę chrzęstną, znajdująca się do przodu od okienka owalnego, w przedniej części podstawy strzemiączka. Rzadziej zmiany obserwuje się w okolicy niszy okienka okrągłego oraz w szczytowej i przyśrodkowej ścianie otoczki kostnej błędnika. Choroba może przebiegać zarówno z zajęciem kości z tyłu okienka owalnego, przedniej i tylnej ściany przewodu słuchowego wewnętrznego, jak i wokół wodociągu ślimaka i kanałów półkolistych oraz w samej podstawie strzemiączka [cyt. z 27, 64, 65]. W aktywnym ognisku otosklerotycznym obserwuje się dużą liczbę komórek wielojądrowych olbrzymich i komórek podobnych do osteoblastów i osteoklastów przejawiających podwyższoną aktywność metaboliczną [56, 62, 66].

Schuknecht i Barber dokonali podziału otosklerozy na kliniczną i histologiczną. Postać kliniczna to schorzenie, w którym występuje niedosłuch przewodzeniowy spowodowany unieruchomieniem podstawy strzemiączka. Postać histologiczna zaś, opisywana jest jako nieprawidłowy obraz mikroskopowy otoczki kostnej błędnika, przebiegająca bez unieruchomienia strzemiączka [64 cyt. wg 65]. Występuje ona około 10 razy częściej niż postać kliniczna [1, 13, 19, 26, 67, cyt. wg 68, cyt. wg 69]. Otoskleroza ślimakowa odnosi się do przypadków otosklerozy histologicznej z zajęciem *endosteum* ślimaka bez unieruchomienia podstawy strzemiączka [cyt wg 65]. Ta postać choroby cechuje się odbiorczym, obustronnym i postępującym upośledzeniem słuchu [9, cyt. wg 65].

Nowe` proponuje podział ognisk otosklerotycznych widzianych w tomografii komputerowej na typ okienkowy, pozaokienkowy (ślimakowy) i mieszany [70],  
( tab. I.)

Tab. I. Lokalizacja ognisk otosklerotycznych w kości skroniowej w tomografii komputerowej

	Typ okienkowy	Typ pozaokienkowy	Typ mieszany
<p>Lokalizacja ogniska otosklerotycznego</p> <p>o</p>	<p>1. Okolice okienka owalnego – najczęściej w fissula ante fenestram z możliwym zajęciem podstawy strzemiączka.</p> <p>2. Boczna ściana błędnika kostnego z zajęciem okienka okrągłego i promontorium</p>	<p>Nieregularne, nieciągłe ogniska hypodensyjności spowodowane demineralizacją warstwy enchondralnej otoczki kostnej</p>	<p>Demineralizacja otoczki kostnej oraz pogrubienie podstawy strzemiączka</p>

### 1.5 Objawy, diagnostyka i leczenie otosklerozy

We wczesnych stadiach, kiedy ogniska otosklerotyczne zlokalizowane są zazwyczaj w przednim lub tylnym biegunie podstawy strzemiączka choroba objawia się niedosłuchem przewodzeniowym. Chorzy lepiej słyszą w hałasie, i na ogół dobrze słyszą własny głos ze względu na dobre słyszenie drogą kostną [9]. Rozwój procesu otosklerotycznego w innych częściach błędnika kostnego może nieść za sobą rozwój niedosłuchu czuciowo-nerwowego, pojawienie się szumów usznych i zawrotów głowy [13, 56, 62, 66].

Choroba występuje najczęściej obustronnie (70-80% przypadków), jednakże jej objawy zwykle nie pojawiają się jednocześnie w obu uszach [1, 8, 15]. W otoskopii obserwuje się przewód słuchowy zewnętrzny ze zmniejszoną ilością woskowiny, niezmienioną, ruchomą błoną bębenkową, często z objawem Schwartz'a - czyli prześwitującym na różowo *promontorium*.

W ustaleniu rozpoznania otosklerozy pomocne są testy stroikowe. W początkowej fazie choroby, w przypadku niedosłuchu przewodzeniowego, w próbie Webera dźwięk lateralizuje w stronę ucha chorego, zaś w próbie Rinneho w uchu chorym otrzymuje się wynik ujemny. Próba Gellégo przy unieruchomieniu płytki strzemiączka wypada ujemnie – patologicznie.

Do rutynowych badań w diagnostyce tej choroby należą badania audiometryczne: audiometria tonalna, słowna i impedancyjna. Wyniki zapisu krzywej progowej w audiometrii tonalnej uzyskuje się w zależności od stopnia unieruchomienia strzemiączka i upośledzenia funkcji ucha wewnętrznego. We wczesnej fazie choroby występuje niedosłuch przewodzeniowy z rezerwą ślimakową większą dla niskich częstotliwości. Wraz ze wzrostem unieruchomienia strzemiączka, zwiększa się rezerwa ślimakowa, niedosłuch przewodzeniowy pojawia się również na wyższych częstotliwościach a krzywe przewodnictwa kostnego i powietrznego stają się bardziej poziome [9, 10, 34]. W pierwszych okresach otosklerozy charakterystyczną cechą audiometryczną świadczącą o unieruchomieniu podstawy strzemiączka jest załamek Carharta. Jest to podwyższenie wartości progowej dla przewodnictwa kostnego o około 5 dB dla 500 Hz, 10 dB dla 1000 Hz 15 dB dla 2000 Hz i 5 dB dla 4000 Hz [9, 10, 54]. W audiometrii mowy w początkowych stadiach choroby uzyskuje się krzywą artykulacyjną równoległą do wzorcowej. W miarę dołączenia się składowej czuciowo-nerwowej krzywa pochyla się i stopniowo osiąga obraz dzwonu lub *plateau* [10]. Ponieważ ciśnienie w uchu środkowym w otosklerozie nie zmienia się, w audiometrii impedancyjnej u większości chorych uzyskuje się prawidłowy tympanogram typu A (wg klasyfikacji Jergera). W zaawansowanych stadiach występuje tympanogramu typu As (wg klasyfikacji Jergera) [71]. W otosklerozie następuje zniesienie odruchu z



mięśnia strzemiączkowego [9, 10, 34].

Pomocnym badaniem w diagnostyce różnicowej oraz w przypadku podejrzenia jednostronnej otosklerozy jest tomografia komputerowa (TK) kości skroniowych. Badanie to odzwierciedla zmiany otosklerotyczne uwidaczniając je jako miejsca o zmniejszonej gęstości w stosunku do otaczającej niezmięnionej kości [9, 72, 73]. W przypadkach niepewnego rozpoznania otosklerozy oraz w ciężkim niedosłuchu odbiorczym w poszukiwaniu demineralizacji struktur ucha wewnętrznego zaleca się wykonanie tomografii komputerowej o wysokiej rozdzielczości (*High Resolution Computed Tomography*, HR-TK) [10, 74].

Leczenie chirurgiczne poprawia słuch chorych na otosklerozę z niedosłuchem przewodzeniowym. Operacja w otosklerozie ma na celu mobilizację układu przewodzącego, czyli przywrócenie prawidłowej ruchomości kosteczek słuchowych. Proces otosklerotyczny jest jednak aktywny, postępuje i w rezultacie wraz z upływem czasu i trwania choroby może prowadzić do niedosłuchu czuciowo-nerwowego. W takim przypadku obecnie nie ma skutecznego leczenia ani chirurgicznego ani farmakologicznego. Badania nad etiopatogenezą tej choroby, których wyniki mogą przyczynić się do ustalenia nowej strategii leczenia trwają nieprzerwanie [27, 62, 75].

W polskim piśmiennictwie z ostatniego dziesięciolecia brakuje doniesień próbujących wyjaśnić patomechanizm powstawania ognisk otosklerotycznych. Autorzy opracowań polskich skupili się głównie na leczeniu operacyjnym i obrazie klinicznym otosklerozy [9, 10, 24, 27-32, 34, 76-105]. Patogenezą tej choroby interesował się Chodyncki, który zaobserwował istotne różnice w poziomie TNF $\alpha$  i IL-1 w surowicy chorych na otosklerozę w porównaniu do surowicy osób z grupy kontrolnej [55]. Konarska za pomocą badań izotopowych oceniała aktywność procesu przebudowy

kostnej w strzemiączkach dotkniętych otosklerozą [106]. W swoich kolejnych badaniach określiła zawartość fluorków i wapnia w kości strzemiączek przebudowanych otosklerotycznie w porównaniu do kości niezmiennych [107].

Niejasne przyczyny powstawania otosklerozy (również w populacji polskiej) skłoniły nas do podjęcia badań nad rolą zakażenia wirusem odry w powstawaniu tej choroby w grupie chorych leczonych w Klinice Otolaryngologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

## **2. CEL PRACY**

1. Wykazanie obecności RNA wirusa odry w strzemiączkach chorych na otosklerozę.

2. Ocena poziomu ekspresji genów: *czynnika martwicy nowotworów (TNF $\alpha$ )*, *interleukiny -1 (IL-1)* i *osteoprotegeryny (OPG)* w tkance kostnej strzemiączka u chorych na otosklerozę oraz ocena korelacji pomiędzy mRNA *OPG* a mRNA *IL-1* i *TNF $\alpha$*  w próbkach odropozytywnych.
3. Ocena związku pomiędzy głębokością niedosłuchu u chorych na otosklerozę a stopniem zaawansowania procesu otosklerotycznego.

### **3. MATERIAŁ I METODY**

#### **3.1 Materiał badań**

Badaniom prospektywnym poddano 61 chorych na otosklerozę leczonych

chirurgicznie w Klinice Otolaryngologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w okresie od 01.12. 2007 r. do 01. 01. 2011r. Wszyscy chorzy wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniach.

Grupę kontrolną stanowiło 31 strzemiączek pobranych ze zwłok osób zmarłych śmiercią nagłą (Zakład Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, kierownik: dr hab. n. med. Zbigniew Jankowski).

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku nr NKEBN/5/2008.

### **3.2 Kwalifikacja chorych do badania**

Do badań włączono 61 chorych leczonych chirurgicznie po raz pierwszy, oraz chorych, u których wykonywano operację tylko jednego ucha. Kryterium włączenia do badań był niedosłuch przewodzeniowy występujący jedno- lub obu usznie z rezerwą ślimakową co najmniej 15 dB oraz śródoperacyjnie stwierdzanym unieruchomieniem podstawy strzemiączka o typie otosklerozy. Kryterium wyłączenia z badań był niedosłuch czuciowo-nerwowy, brak rezerwy ślimakowej, przewlekłe zapalenie ucha środkowego, tympanoskleroza, uszkodzenie łańcucha kosteczek słuchowych i reoperacje po stapedotomii.

### **3.3 Dane epidemiologiczno-kliniczne**

Przeanalizowano: wiek, płeć, przebyte cięższe, przebyte zachorowanie na odrę, szczepienie przeciwko odrze, przebyte urazy głowy, wywiad rodzinny w kierunku niedosłuchu. Zebrano wywiad dotyczący niedosłuchu, szumów usznych i zawrotów głowy, czasu ich wystąpienia, długości trwania oraz stronności. Leczenie niedosłuchu u

chorych z otosklerozą polegało na leczeniu operacyjnym z usunięciem części podstawy strzemiączka oraz suprastruktury. Wszystkie dane epidemiologiczno - kliniczne zebrano w komputerowej bazie danych (Arkusz kalkulacyjny OpenOffice.org).

### **3.4 Badania słuchu**

Badania wykonano w Pracowni Audiologicznej Kliniki Otolaryngologii.

#### **3.4.1 Próby stroikowe**

U każdego pacjenta wykonano próby: Webera, Rinneho oraz Gellégo.

#### **3.4.2 Audiometria tonalna**

Badanie wykonano w pozycji siedzącej, w ekranowanym akustycznie pomieszczeniu przy użyciu audiometru Midimate 622 firmy Madsen Electronics Ltd. Na podstawie danych z audiogramów chorych z niedosłuchem, obliczano poziom niedosłuchu dla częstotliwości 0,5; 1; 2 i 4 Hz oraz wyznaczano wartość rezerwy ślimakowej dla tych częstotliwości. Dla oceny niedosłuchu zastosowano skalę ubytków słuchu przedstawioną przez Kochanka [71], zgodnie z którą rozpoznawano niedosłuch przy ubytku słuchu przekraczającym 20 dB HL, mierzonym jako średnia arytmetyczna z wartości progów uzyskanych dla częstotliwości 0,5; 1 i 2 kHz, (tabela II)

Tab. II. Podział ubytków słuchu w zależności od wielkości niedosłuchu wg Kochanka

Stopień ubytku słuchu	Przedział ubytku słuchu
norma	poniżej 20 dB HL
niewielki	21-40 dB HL

umiarkowany	41-55 dB HL
średni	56-70 dB HL
głęboki	56-90 dB HL
bardzo głęboki	powyżej 90 dB HL

### 3.4.3 Audiometria impedancyjna

Tympanometria i odruchy z mięśnia strzemiączkowego. Badanie wykonano przy użyciu zestawu Zodiak 901, firmy Madsen Electronics Ltd.

### 3.5 Skala unieruchomienia strzemiączka

Chorych z otosklerozą operowano w znieczuleniu miejscowym z dojścia poprzez tympanotomię wewnątrzprzewodową wg Rosena. W czasie zabiegu wykonywano stapedotomię (usunięcie suprastruktury strzemiączka z przednią częścią płytki strzemiączka) z umieszczeniem w przedsionku teflonowo-platynowej protezki strzemiączka. Śródoperacyjnie oceniano stan strzemiączka, stan niszy okienka owalnego i okrągłego, ruchomość strzemiączka z uwzględnieniem stopnia jego unieruchomienia według skali Portmanna [7], (tab. III). Zgodnie z tą klasyfikacją określono stopień zaawansowania procesu otosklerotycznego w uchu środkowym.

Tab. III. Stadia unieruchomienia strzemiączka wg Portmanna

Stadium unieruchomienia strzemiączka	Morfologia strzemiączka
--	-------------------------

Typ 1	Strzemiączko i więzadło pierścieniowate o normalnym wyglądzie. Nieznaczne stwardnienie więzadła pierścieniowatego w części przedniej.
Typ 1a	Stwardnienie na całym obwodzie płytki. Unieruchomienie strzemiączka.
Typ 2	Unieruchomienie płytki strzemiączka w części przedniej lub tylnej proces otosklerotyczny obejmuje < niż 25 % okienka owalnego.
Typ 2 a	Jak w typie 2 + stwardnienie więzadła pierścieniowatego na całym obwodzie.
Typ 3	Unieruchomienie płytki strzemiączka w części przedniej i tylnej, proces otosklerotyczny obejmuje 50 % okienka owalnego.
Typ 3 a	Całkowite unieruchomienie płytki strzemiączka.
Typ 4	Proces otosklerotyczny obejmuje całkowicie płytkę strzemiączka, pogrubienie płytki.
Typ 5	Całkowita obliteracja płytki strzemiączka w okienku owalnym. Okienko owalne jest widoczne w postaci niewielkiego wgłębienia pomiędzy ogniskiem otosklerotycznym przednim i tylnym.

### 3.6 Materiał do badań molekularnych

Materiał do badań molekularnych stanowiły części płytki oraz suprastruktury strzemiączek pochodzące od pacjentów chorych na otosklerozę, które zostały usunięte w trakcie zabiegu stapedotomii. Wszystkie operacje wykonywane były tą samą techniką przez jednego operatora (J.K.).

Strzemiączko jest najmniejszą kością organizmu ludzkiego, jego długość wynosi średnio 2,612 mm, a szerokość podstawy średnio 2,298 mm [108]. Suprastruktura strzemiączka waży poniżej 1 mg.

Materiał pooperacyjny (suprastruktury strzemiączka z częścią płytki) natychmiast po pobraniu od chorego umieszczano w buforze stabilizującym RNA, zawierającym inhibitory RNAz (RNA-later, RNA Stabilization Reagent, firma Qiagen), a następnie transportowano do Zakładu Medycyny Molekularnej GUMed, gdzie przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz. Grupę kontrolną stanowiły strzemiączka pobierane ze zwłok (osób zmarłych śmiercią nagłą), przechowywane w temperaturze 4°C w Zakładzie Medycyny Sądowej do 48 godzin od śmierci [109]. Pobrane strzemiączka ze zwłok umieszczano w buforze stabilizującym RNA-later, następnie transportowano do Zakładu Medycyny Molekularnej, gdzie przechowywano je w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz.

### **3.7 Metody badań molekularnych**

#### **3.7.1 Izolacja całkowitego RNA z tkanek**

Badania zostały przeprowadzone w Zakładzie Medycyny Molekularnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Całkowite RNA wyizolowano z tkanek stosując metodę izolacji RNA według procedury Chomczyńskiego z modyfikacjami [110]. Uzyskane w czasie operacji fragmenty strzemiączek (suprastruktura i część płytki) umieszczano w moździerz, dodawano 500 µl Trireagentu (Sigma) a następnie je rozcierano. Mieszaninę roztartej kosteczki i Trireagentu przenoszono do jałowych 2 ml probówek typu Eppendorf i inkubowano 10 minut w lodzie. Następnie dodawano 200 µl chloroformu, intensywnie wytrząsano i dalej inkubowano przez 15 minut w lodzie. Wodną warstwę mieszaniny rozdzielano przez wirowanie w wirówce z chłodzeniem przy max. obrotach 12000 obr/min (G - 10000) przez 15 minut w



temperaturze 4° C. Do nowej 1,5 ml probówki typu Eppendorf pobierano górną frakcję i dodawano równoważną ilość schłodzonego izopropanolu. Po dokładnym wymieszaniu inkubowano w temperaturze – 20 °C przez 24 godziny. Wytrącone RNA odwirowywano przy 10000 G - przez 15 minut w temperaturze 4° C. Supernatant usuwano a osad przemywano najpierw schłodzonym 90% a potem 70% etanolem i osuszano. Do oczyszczonego RNA dodawano 11 µl jałowej, wolnej od RNaz wody. Tak przygotowane RNA przechowywano w temperaturze – 20°C do czasu przeprowadzenia dalszych analiz.

### **3.7.2 Ocena ilości transkryptu badanych genów za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (*Real-time PCR*)**

Określenie poziomu ekspresji genów *IL-1*, *OPG* i *TNF-α* z równoczesną amplifikacją transkryptu genu referencyjnego (*beta-aktyna*) wykonywano za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem sond typu *HybProbe* znakowanych fluorescencyjnie. Reakcja odwrotnej transkrypcji w celu uzyskania cDNA i reakcja PCR z wykorzystaniem cDNA jako matrycy przeprowadzane były jednoetapowo w LightCycler firmy Roche, przy wykorzystaniu zestawu komercyjnego firmy Roche (LightCycler RNA Master HybProbe, Roche Diagnostics GmbH Mannheim Germany) wg instrukcji producenta. Reakcję amplifikacji mRNA badanego genu wraz z genem beta aktyny przeprowadzano w szklanych kapilarach w objętości 10 µl środowiska zawierającego: 3,75 µl Master HybProbe, 3,25 mM Mn[OAc]<sub>2</sub>, 0,5 µM każdego ze starterów (tab. IV), 0,2 µM każdej sondy hybrydizacyjnej FL i LC dla badanego transkryptu oraz 0,2 µM sondy FL i 0,4 µM sondy LC dla *β-aktyny* 2 µl całkowitego RNA wyizolowanego ze strzemiączek. Do reakcji stosowano startery i

sondy o sekwencji przedstawionej w tabeli IV. Każda reakcja amplifikacji posiadała kontrolę negatywną, do której dodawano wodę zamiast RNA. Kontrolę pozytywną reakcji amplifikacji *IL-1* i *TNF- $\alpha$*  stanowiło całkowite RNA wyizolowane z linii komórkowej limfocytów SKW 6.4. Kontrolę pozytywną reakcji amplifikacji *OPG* stanowiło całkowite RNA wyizolowane z linii komórkowej osteosarcoma - 143 b. Dla każdej analizowanej próby obliczano stosunek cDNA danego badanego transkryptu (*IL-1b*, *TNF $\alpha$* , *OPG*) do ilości cDNA transkryptu referencyjnego genu  $\beta$ - *aktyny*.

Tab. IV. Sekwencje primerów i sond w reakcji PCR w czasie rzeczywistym amplifikacji mRNA *IL-1*, *OPG* i *TNF- $\alpha$*

<i>OPG</i>	<i>Primery</i>	F	AAgggCgCTACCTTgAgATA
		R	CATCTATTCCACATTTTTgAgTTgAT

	<i>Sondy</i>	FL	CAATTTgTgTgTTTTCTACAgggTgCTT-FL
		LC	640-AgATgACgTCTCATTTgAgAAgAACCCAT-PH
<i>TNF- <math>\alpha</math></i>	<i>Primery</i>	F	ACAAGCCTgTAgCCCATgTT
		A	AAgAggACCTgggAgTAgATgA
	<i>Sondy</i>	FL	gCATTggCCCggCggTTC-FL
		LC	640-CCACTggAgCTgCCCCTCAgCT--PH
<i>IL-1b</i>	<i>Primery</i>	S	CAGggACAggATATggAgCAA
		A	gCAgACTCAAATTCCAgtTgTTA
	<i>Sondy</i>	FL	gCTTATCATCTTTCAACACgCAggACA-FL
		LC	640-gTACAgATTCTTTTCCTTgAggCCCA--PH
<i><math>\beta</math>-aktyna</i>	<i>Primery</i>	F	AgCCTCgCCTTTgCCgA
		R	CTggTgCCTggggCg
	<i>Sondy</i>	FL	TTgCACATgCCggAgCCgTTg-FL
		LC	705-CgACgACgAgCgCggCgATATC--PH

### 3.7.3 Wykrywanie RNA wirusa odry

Obecność RNA wirusa odry oceniano za pomocą PCR w czasie rzeczywistym przy wykorzystaniu zestawu komercyjnego firmy Roche (LightCycler RNA Master HybProbe, Roche Diagnostics GmbH Mannheim Germany) wg instrukcji producenta. Reakcję amplifikacji RNA wirusa odry przeprowadzano w szklanych kapilarach w objętości 10  $\mu$ l środowiska zawierającego: 3,25 mM  $Mn[OAc]_2$ , 0,5  $\mu$ M każdego ze staterów KVV3 jako starter do reakcji odwrotnej transkrypcji i starter wprost oraz KVV2R jako starter odwrócony, 0,2  $\mu$ M każdej z sond: MeaFL i MeaLC oraz 3,75  $\mu$ l

Master HybProbe. Do reakcji używano 2 µl całkowitego RNA wyizolowanego ze strzemiączek. Każda reakcja amplifikacji posiadała kontrolę negatywną, do której dodawano wodę zamiast RNA. Kontrolę pozytywną w reakcji amplifikacji wirusa odry stanowiło RNA wyizolowane ze szczepionki PRIORIX zawierającej żywe, atenuowane wirusy odry, szczep Schwarz. Primery i sondy stosowane do reakcji przedstawiono w tabeli V. Sekwencje tych oligonukleotydów zostały zaczerpnięte z publikacji [111].

Tab. V. Sekwencje primerów i sond w reakcji PCR w czasie rzeczywistym amplifikacji wirusa odry

KVW3	5'-CTT gTTTCA gAg ATTgCA ATgCAT-3'
KVW2R	5'-ggC CTC TCg CAC CTA gTC TAG-3'
MeaFL	5'-AAgCCAgggAgAgCTACAgAgAAACC-Flu
MeaLC	LC Red 640-CCCAgCAgAgCAAgTgATgCgAgA-p

### 3.8 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonał dr Jacek Buczny przy użyciu programu SPSS 15.0. Zastosowano statystyki opisowe takie jak średnia arytmetyczna jako miarę tendencji centralnej (*M*) oraz odchylenie standardowe (*SD*) jako miarę zróżnicowania wyników. Dane zaprezentowano także w postaci zestawień procentowych oraz tabel informujących o rozkładzie liczebności obiektów w grupach. W odpowiednich miejscach prezentowano także przedziały ufności dla średniej arytmetycznej z 95% dokładnością. W procesie wnioskowania statystycznego przyjęto, że o wyniku znamionym statystycznie można mówić, gdy uzyskiwany poziom istotności (*p*) jest mniejszy od granicznego *alfa* (*alfa* = 0,05), wynik nieistotny oznaczono „*n.i.*”. O

normalności rozkładu zmiennych decydowano na podstawie testu Kołmogorova-Smirnova (test K-S). W przypadku uzyskania istotności (znamienności) statystycznej testu podejmowano decyzję o tym, że rozkład zmiennej nie jest normalny. Fakt ten nie miał wpływu na wybór innych testów statystycznych, np. istotności różnic między średnimi, gdyż jak pokazały analizy Monte Carlo (testy wiarygodności testów statystycznych) brak normalności rozkładu nie ogranicza stosowania parametrycznych testów istotności różnic bądź związków między zmiennymi.

Pierwszy test statystyczny wykorzystano w celu zbadania relacji między zmiennymi mierzonymi na skali nominalnej (jakościowej) albo w sytuacji, gdy jedna ze zmiennych mierzona była na skali nominalnej a druga na porządkowej. Analizy wykonano za pomocą testu  $\chi^2$  oraz wskaźnika  $V$  Cramera pochodnej testu  $\chi^2$ , ukazującego stopień korelacji między analizowanymi zmiennymi i założono, że wartość wynosząca około 0,25 oznacza niską korelację, 0,50 średnią korelację, zaś około 0,75 wysoką korelację pomiarów. Następnym był test  $t$  Studenta, który wykorzystano, gdy jedna ze zmiennych mierzona była na skali nominalnej i miała dwa poziomy (dwie grupy) i gdy druga zmienna mierzona była na skali ilościowej. Dla każdej wartości testu  $t$  obliczono wskaźnik  $d$  Cohena. Wskaźnik  $d$  informuje o sile efektu, to jest rzeczywistej wielkości (znaczeniu) analizowanej różnicy między średnimi. Przyjęto, że  $d > 0,20$  wskazuje na mały efekt (niewiele znaczącą różnicę);  $d \approx 0,50$  oznacza średni efekt, zaś  $d > 0,80$  wskazuje na duży efekt (dużą różnicę między średnimi). Kolejną techniką analityczną była jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA). Znamienność statystyczną efektu obrazuje wartość i istotność statystyki  $F$ . Technikę tę wykorzystano, gdy jedna ze zmiennych mierzona była na skali nominalnej, a jej poziomów było co najmniej trzy (trzy grupy) i gdy druga

zmienna mierzona była na skali ilościowej. Dodatkowo wyliczono wskaźnik siły efektu – cząstkowe *eta-kwadrat* ( $\eta^2$ ) czyli standaryzowaną wielkość różnicy między średnimi. Przyjęto, że  $\eta^2 \approx 0,1$  oznacza słaby efekt,  $\eta^2 \approx 0,25$  efekt średni, a  $\eta^2 > 0,50$  efekt duży. Relacje między zmiennymi analizowano za pomocą współczynnika korelacji  $r$  Pearsona, gdy każda ze zmiennych mierzona była na poziomie ilościowym, w innym przypadku sięgano po współczynnika korelacji rangowej  $\rho$  (*rho*) Spearmana. Założono, że wartości wynoszące około 0,20 (i - 0,20) oznaczają niską korelację, 0,60 (i - 0,60) średnią korelację a około 0,80 (i - 0,80) wysoką korelację pomiarów. Wielowymiarowe relacje między zmiennymi ilościowymi analizowano za pomocą analizy regresji.

W celu określenia rzetelności pomiarów przewodnictwa powietrznego i przewodnictwa kostnego wykorzystano wskaźnik  $\alpha$  Cronbacha (dla zmiennych mierzonych na skali ilościowej). Przyjęto, że wartości między 0,60 a 0,79 oznaczają przeciętną stabilność czasową pomiarów, natomiast pomiędzy 0,80 a 1,00 wysoką stabilność czasową.

#### **4. WYNIKI**

#### 4.1 Charakterystyka epidemiologiczno-kliniczna

Przeanalizowano grupę 61 chorych na otosklerozę (grupa badana), leczonych operacyjnie w Klinice Otolaryngologii GUMed. Do badań molekularnych użyto 61 fragmentów strzemiączek, czyli część płytki i suprastrukturę (strzemiączka) uzyskanych na drodze operacyjnej od tych chorych. Grupą kontrolną dla badań było 31 strzemiączek pobranych z ucha środkowego ze zwłok osób zmarłych śmiercią nagłą (Zakład Medycyny Sądowej GUMed).

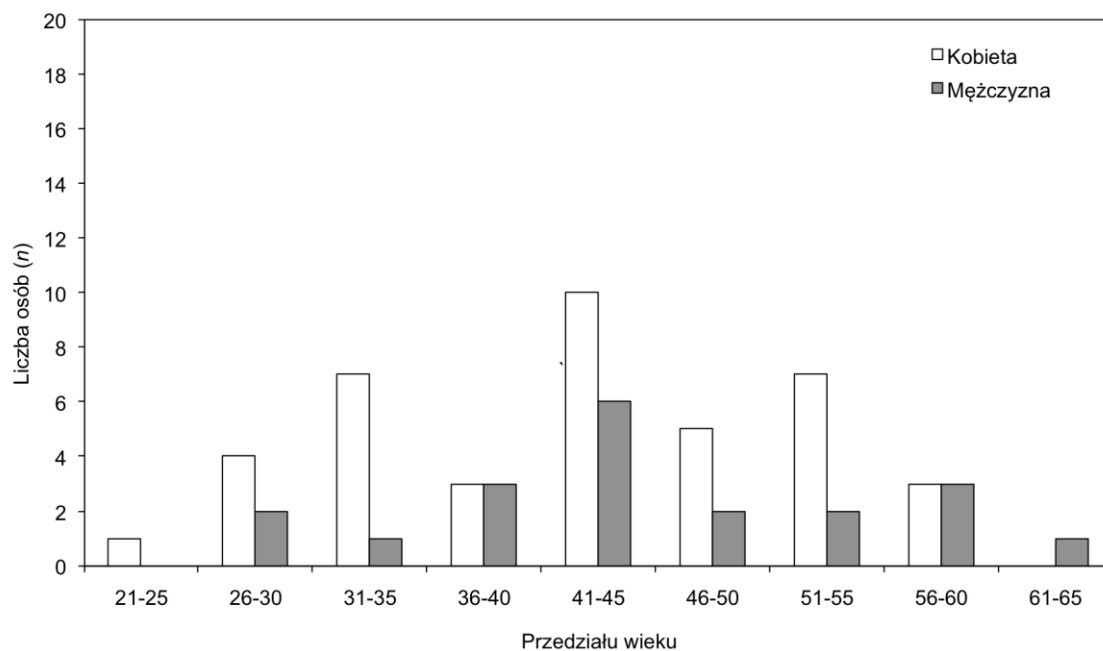
W analizowanej grupie było 40 kobiet (65,6%) oraz 21 mężczyzn (34,4%). Stosunek kobiet do mężczyzn wynosił 1,9 : 1.

Średnia wieku badanej populacji wynosiła 43,49 ( $SD = 9,66$ ). Wiek chorych z uwzględnieniem płci przedstawia rycina 2. Wiek kobiet nie różnił się znamienne od mężczyzn (kobiety:  $M = 42,98$ ;  $SD = 9,67$ ; mężczyźni:  $M = 44,48$ ;  $SD = 9,80$ ). W badanej populacji przeważały osoby w 5 dekadzie życia, (ryc.2).

Zmiany chorobowe dotyczyły w większości jednego ucha u chorych.

Na otosklerozę jednostronną cierpiało 70,5% badanych chorych, a obustronną 29,5%. U 27 chorych (44,3%) przeprowadzono operację lewego ucha, u 34 (55,7%) ucha prawego.

Średni czas od pojawienia się objawów choroby, najczęściej niedosłuchu, wynosił 9 lat ( $SD = 8,02$ ). Okres trwania choroby nie różnił się znamienne pomiędzy kobietami a mężczyznami (kobiety:  $M = 8,91$ ;  $SD = 8,514$ ; mężczyźni:  $M = 9,19$ ;  $SD = 7,12$ )



Ryc. 2. Wiek chorych z uwzględnieniem płci

W badanej populacji 35 kobiet podało liczbę przeżytych ciąży, wśród nich 31 (88,5%) było przynajmniej raz w ciąży, (ryc.3.) Doustną antykoncepcję stosowało 5 kobiet (od 3 miesięcy do 3 lat), 1 kobieta przyjmowała hormonalną terapię zastępczą.

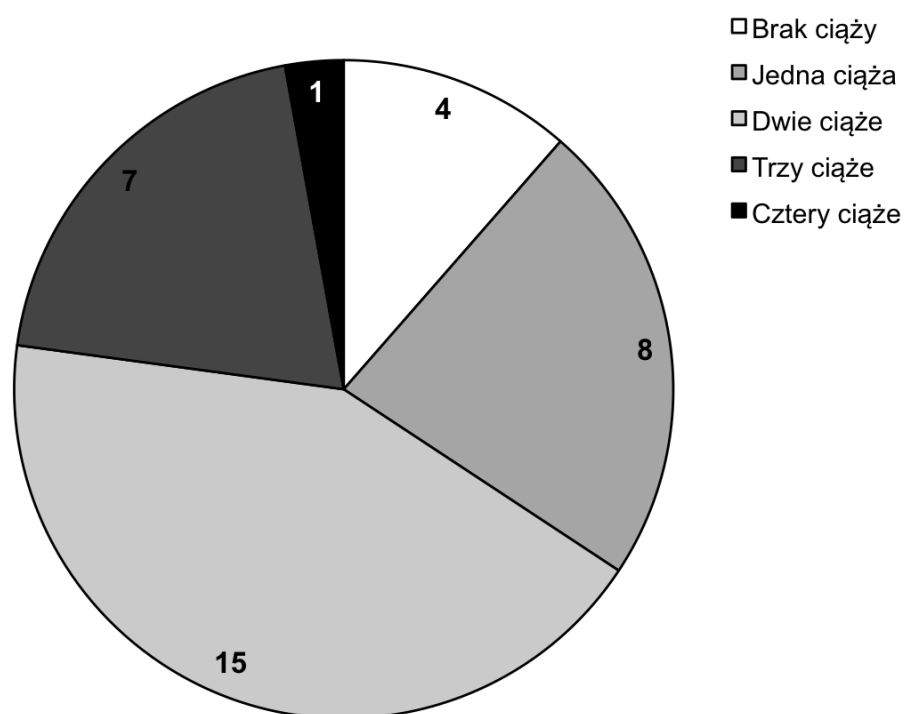
U 26 badanych chorych (42,6%) występował niedosłuch wśród członków ich rodzin (dane z wywiadu), (tab. VI).

Tab. VI. Występowanie niedosłuchu w rodzinie

Występowanie rodzinne	Częstość
Tak	26 (42,6%) <sup>a</sup>
Nie	17 (27,9%)
Nie wiadomo	18 (28,5%)

<sup>a</sup>Procent całej grupy klinicznej ( $n = 61$ ).





Ryc. 3. Częstość występowania ciąży wśród badanych pacjentek

#### 4.2 Objawy otologiczne

21 osób zgłaszało niedosłuch jednostronny (34,4%), 40 obustronny (65,6%). Szumy uszne zgłosiło 44 pacjentów (72,1%), wśród których na obustronne szumy skarżyło się 19 (43,2%). Występowanie szumów podało 77,5% kobiet, 62% mężczyzn, (tab. VII).

Tab. VII. Występowanie szumów usznych u chorych w zależności od płci

Szumy	Płeć	
	Kobieta	Mężczyzna
Tak	31 (77,5%) <sup>a</sup>	13 (62%) <sup>b</sup>
Nie	9 (22,5%)	8 (38%)

<sup>a</sup>Procent grupy kobiet ( $n = 40$ ), <sup>b</sup>procent grupy mężczyzn ( $n = 21$ )

U 6 chorych (9,83%) występowały szумы o wysokiej częstotliwości określane jako piski w chorym uchu, (tab. VIII)

Tab. VIII. Występowanie pisków w uszach u chorych w zależności od płci

Piski	Płeć	
	Kobieta	Mężczyzna
Tak	3 (7,5%) <sup>a</sup>	3 (14,3%) <sup>b</sup>
Nie	37 (92,5%)	18 (85,7%)

<sup>a</sup>Procent grupy kobiet ( $n = 40$ ), <sup>b</sup> procent grupy mężczyzn ( $n = 21$ )

W badanej populacji 36 pacjentów (59%) zgłaszało okresowe zawroty głowy. W większości były to kobiety - 57,4% badanych chorych, (tab. IX)

Tab. IX. Występowanie zawrotów głowy u chorych w zależności od płci

Zawroty głowy	Płeć	
	Kobieta	Mężczyzna
Tak	35 (87,5%) <sup>a</sup>	1 (4,8%) <sup>b</sup>
Nie	5 (12,5%)	20 (95,2%)

<sup>a</sup>Procent grupy kobiet ( $n = 40$ ), <sup>b</sup> procent grupy mężczyzn ( $n = 21$ )

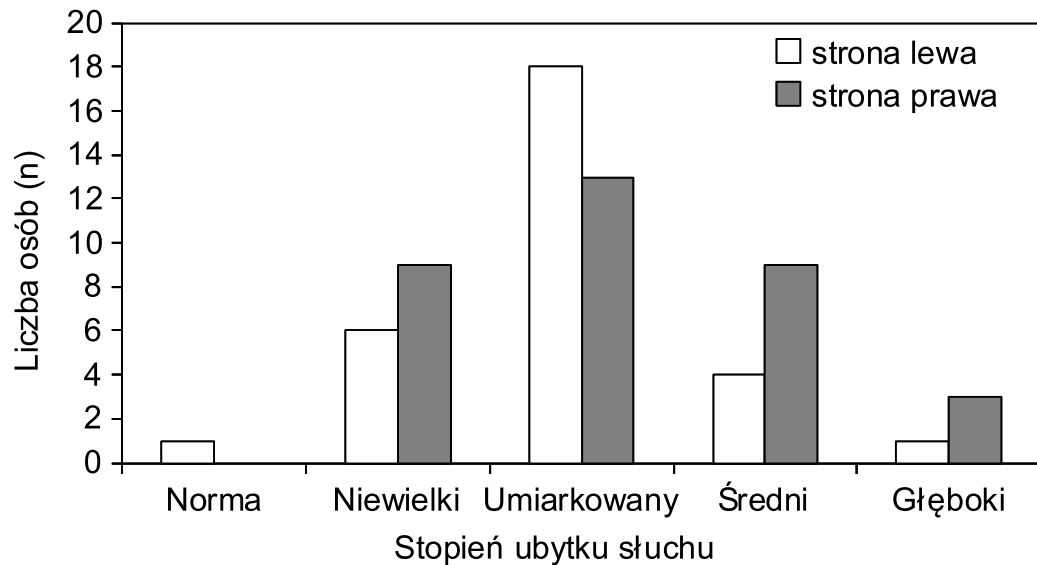
### 4.3 Wyniki badań audiologicznych

#### 4.3.1 Wyniki audiometrii tonalnej

Przeprowadzono ogólną charakterystykę pomiarów niedosłuchu. Okazało się, że pomiary przewodnictwa powietrznego dla wszystkich częstotliwości (500, 1000 i 2000 Hz) były rzetelne, gdyż  $\alpha$  Cronbacha wynosiła 0,93. Bardzo podobne wyniki

uzyskano dla wszystkich częstotliwości pomiaru przewodnictwa kostnego, gdzie  $\alpha$  Cronbacha wyniosła 0,81. Uzyskane rzetelności są wysokie i w pełni satysfakcjonujące.

Częstość występowania stopnia ubytku słuchu prezentuje rycina 4. Najwięcej osób charakteryzowało się umiarkowanym niedosłuchem.



Ryc. 4. Rozkład liczebności kategorii niedosłuchu zależnie od strony operowanej

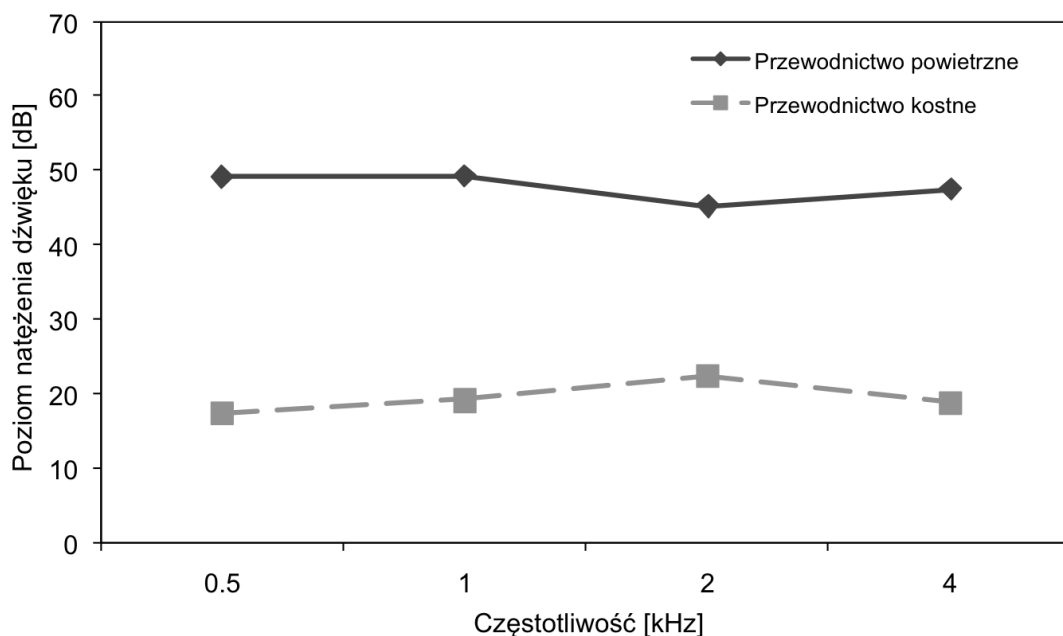
W badanej grupie 36 chorych (59%) cierpiało na niedosłuch przewodzeniowy a 25 chorych (41%) w badaniu audiometrycznym wykazywało niedosłuch mieszany.

Załamek Carharta stwierdzono u 28 badanych chorych (46%). U 17 pacjentów załamek wystąpił przy 2 kHz, u 5 przy 1 kHz, a u 6 przy 0,5 kHz.

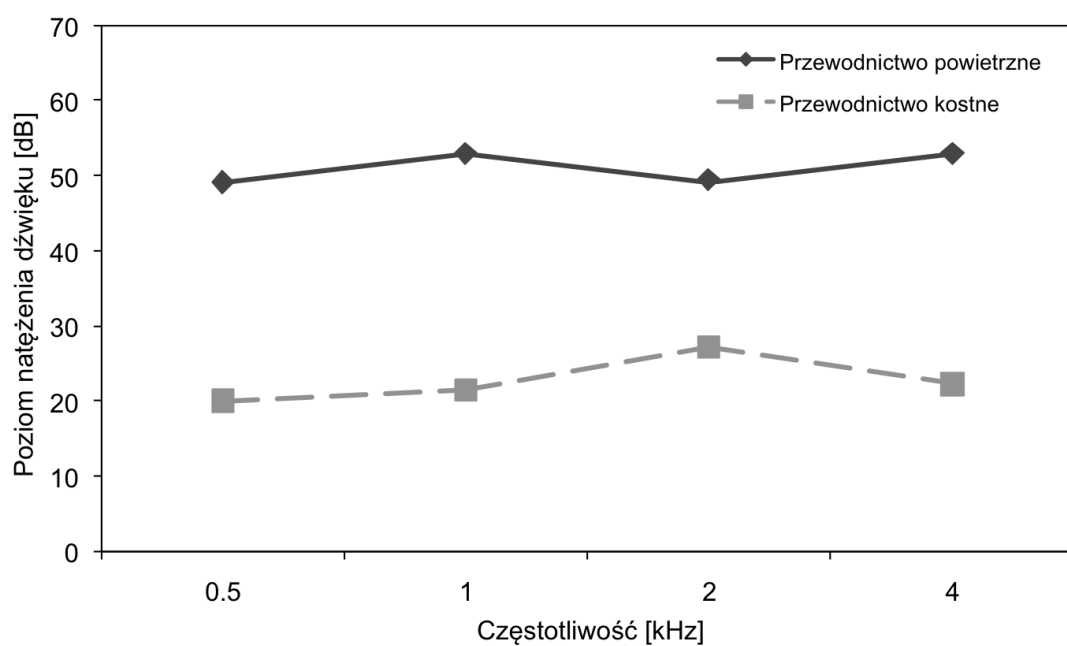
Tab. X. Średni ubytek słuchu dla poszczególnych częstotliwości oraz wybranych grup częstotliwości w zależności od strony operowanej

	Ucho operowane			
	Lewe		Prawe	
Częstotliwości pojedyncze / grupy częstotliwości [kHz]	M	SD	M	SD
0,5	49,07	13,23	49,12	15,10
1	49,26	11,94	52,94	13,43
2	45,19	14,44	49,41	14,80
4	47,41	16,31	52,94	18,51
PTA <sup>a</sup>	47,84	11,86	50,49	13,49
PTMA <sup>b</sup>	47,62	12,62	51,71	14,40

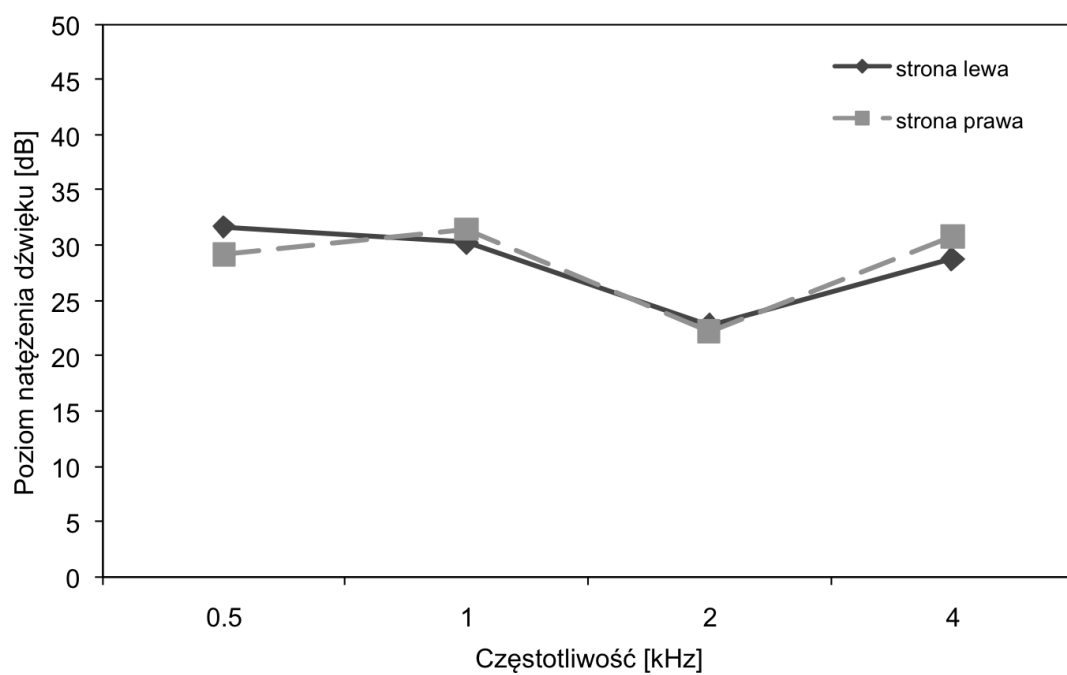
<sup>a</sup>PTA – (*pure tone average*) średnia z częstotliwości 0,5; 1; 2 kHz. <sup>b</sup>PTMA – (*pure middle tone average*) średnia z częstotliwości 0,5; 1; 2; 4 kHz.



Ryc. 5. Przewodnictwo powietrzne i kostne po stronie operowanej (ucho lewe)



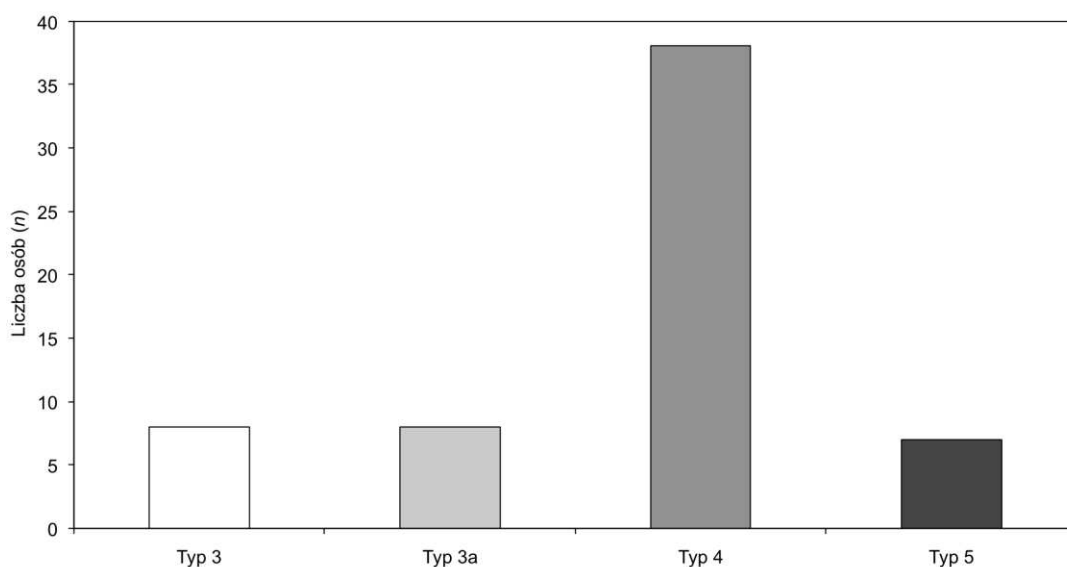
Ryc. 6. Przewodnictwo powietrzne i kostne po stronie operowanej (ucho prawe)



Ryc. 7. Rezerwa ślimakowa ucha operowanego

#### 4.3.2 Stopień zaawansowania procesu otosklerotycznego

Przeprowadzono ogólną charakterystykę stopnia zaawansowania procesu otosklerotycznego (zaawansowanie kliniczne otosklerozy) wg skali Portmanna, stwierdzanego podczas operacji. Najczęściej występował typ 4, nie zaobserwowano występowania stopni zaawansowania 1 i 2 w uszach operowanych. (ryc. 8)



Ryc. 8. Rozkład stopni unieruchomienia strzemiączka (wg Portmanna)

Nie zaobserwowano związku pomiędzy głębokością niedosłuchu a stopniem zaawansowania procesu otosklerotycznego.

Nie wykazano również związku pomiędzy wartością rezerwy ślimakowej a stopniem zaawansowania procesu otosklerotycznego. Analiza korelacji przeprowadzona za pomocą korelacji Spearmana  $\rho$  nie ujawniła istotnych związków

między badanymi zmiennymi.

#### 4.3.3 Wyniki audiometrii impedancyjnej

Wykonano badanie tympanometryczne i badanie odruchów z mięśnia strzemiączkowego. U 61,5% badanych uzyskano prawidłowy tympanogram typu A, u 38,5% zaś tympanogram typu As, (tab. XI)

U wszystkich chorych stwierdzono brak odruchów z mięśnia strzemiączkowego.

Tab. XI. Wyniki tympanometrii.

Tympanogram	%
A	61,50%
As	38,50%

#### 4.3.4 Próby stroikowe

Tab. XII. Wyniki próby Webera

Lokalizacja	Strona operowana	
	Lewa	Prawa
Słyszalność stroika (strona)		
Lewa	17 (27,9%) <sup>a</sup>	4 (6,6%)
Prawa	2 (3,3%)	23 (37,7%)
Środek głowy	8 (13,1%)	7 (11,5%)

<sup>a</sup>Procent całej grupy klinicznej ( $n = 61$ ).

Tab. XIII. Wyniki próby Rinneho

Strona operowana		
Lewa		Prawa
(ucho lewe)		
Dodatnia	4 (6,6%) <sup>a</sup>	24 (39,3%)
Ujemna	23 (37,7%)	10 (16,4%)
(ucho prawe)		
Dodatnia	20 (32,8%)	11 (18%)
Ujemna	7 (11,5%)	23 (37,7%)

<sup>a</sup>Procent całej grupy klinicznej ( $n = 61$ ).

Tab. XIV. Wyniki próby Gellégo

Strona operowana		
Lewa		Prawa
Ucho		
Lewe (patologiczna)	17 (27,9%) <sup>a</sup>	3 (4,9%)
Prawe (patologiczna)	2 (3,3%)	15 (24,6%)
Lewe i Prawe (patologiczna)	3 (4,9%)	6 (9,8%)
Wątpliwa	2 (3,3%)	9 (14,8%)
Prawidłowa obustronnie	3 (4,9%)	1 (1,6%)

<sup>a</sup>Procent całej grupy klinicznej ( $n = 61$ ).

#### 4.3.5 Poziom głębokości niedosłuchu i stopień zaawansowania procesu



### **otosklerotycznego zależnie od zmiennych dodatkowych**

Zbadano związek między poziomem głębokości niedosłuchu i wartością rezerwy ślimakowej a wiekiem, czasem trwania choroby oraz liczbą przebytych cięż. Analiza wykonana za pomocą korelacji  $r$  Pearsona nie ujawniła istotnych związków między badanymi zmiennymi.

Ponadto nie ujawniono związku między poziomem ubytku słuchu i rezerwą ślimakową a:

- płcią,
- przebytym zachorowaniem na odrę,
- szczepieniem przeciwko odrze,
- występowaniem niedosłuchu w rodzinie,
- występowaniem szumów, zawrotów głowy, i pisków,
- wynikiem tympanometrii,
- obecnością odruchu strzemiączkowego.

Związki te nie ujawniły się zarówno w grupie z operowanym lewym jak i prawym uchem.

Sprawdzono czy istnieje związek między poziomem ubytku słuchu i wartością rezerwy ślimakowej a wiekiem, długością trwania procesu otosklerotycznego oraz liczbą cięż zależnie od strony operowanej i rodzaju niedosłuchu (jednostronny vs. obustronny). W grupie pacjentów z operowanym lewym uchem ( $n = 27$ ) nie zaobserwowano związków między zmiennymi bez względu na to, czy badano je w grupie pacjentów z niedosłuchem jednostronnym ( $n = 11$ ) czy obustronnym ( $n = 16$ ).

W grupie chorych z operowanym prawym uchem ( $n = 34$ ) zaobserwowano istotny związek między długością trwania procesu otosklerotycznego a poziomem

niedosłuchu, gdyż  $r = 0,55$  ( $p < 0,05$ ; test jednostronny) w grupie z niedosłuchem jednostronnym ( $n = 10$ ) i  $r = 0,45$  ( $p < 0,05$ ; test jednostronny) w grupie z niedosłuchem obustronnym ( $n = 24$ ).

Nie zaobserwowano związku między stopniem zaawansowania procesu otosklerotycznego (wg Portmanna) a:

- płcią,
- przebytym zachorowaniem na odrę,
- szczepieniem przeciwko odrze,
- występowaniem niedosłuchu w rodzinie,
- występowaniem szumów, zawrotów głowy i pisków,
- wynikiem tympanometrii,
- obecnością odruchu strzemiączkowego.

Analiza nie ujawniła istotnych zależności między badanymi zmiennymi.

Wyjątkiem był tutaj związek między zaawansowaniem procesu otosklerotycznego a długością trwania tego procesu, gdyż  $r = 0,21$  ( $p < 0,05$ ; test jednostronny).

## **4.4 Wyniki badań molekularnych**

### **4.4.1 Obecność RNA wirusa odry w badanym materiale**

Obecność RNA wirusa odry wykryto u 80,3% chorych na otosklerozę (grupa kliniczna).

W strzemiączkach pobranych ze zwłok (grupa kontrolna) RNA wirusa obecny był w 3 badanych próbkach. (tab. XV)

Dokonano analizy statystycznej częstości występowania RNA wirusa odry u chorych na otosklerozę i w grupie kontrolnej. Wykazano, że częstość występowania odry jest istotnie większa w grupie klinicznej niż w grupie kontrolnej. Analiza wykazała, że różnica w częstości występowania odry zależnie od grupy była znamienna statystycznie ( $\chi^2(1, 88) = 41,75; p < 0,001; V = 0,67$ ).

Tab. XV. Rozkład częstości występowania RNA wirusa odry w strzemiączkach chorych na otosklerozę i w grupie kontrolnej

RNA WIRUSA ODRY		
Grupa	Obecne	Nieobecne
Kliniczna	49	12
Kontrolna	3	28

#### 4.3.2 Związek między obecnością RNA wirusa odry a obecnością mRNA:

##### *TNF $\alpha$ , IL-1 i OPG*

W 40 odropozytywnych ( z obecnym RNA wirusa odry) strzemiączkach (81,6%) ( $n = 49$ ) zmienionych otosklerotycznie i w 11 strzemiączkach, bez obecności RNA wirusa wykryto mRNA *TNF $\alpha$* , (tab. XVI).

Obecność mRNA *IL-1* stwierdzono w 46 (93,8%) strzemiączkach z RNA wirusa odry ( $n = 49$ ) i w 10 bez RNA wirusa, (tab. XVII).

Obecność mRNA *OPG* zaobserwowano w 18 (36,7%) strzemiączkach odropozytywnych z badanej grupy ( $n = 49$ ) i w 5 próbkach wolnych od RNA wirusa, (tab. XVIII).

Odwrotna sytuacja miała miejsce w strzemiączkach nie objętych procesem otosklerotycznym, pobranych ze zwłok ( $n = 31$ ), (tab. XVI, XVII i XVIII).

Tab. XVI. Obecność mRNA *TNF $\alpha$*  w strzemiączkach chorych na otosklerozę i w strzemiączkach z grupy kontrolnej w zależności od obecności RNA wirusa odry

RNA WIRUSA ODRY			
		obecny	nieobecny
<i>Grupa badana (n = 61)</i>			
mRNA <i>TNF<math>\alpha</math></i>	51 (83,6%)	40	11
<i>Grupa kontrolna (n = 31)</i>			
mRNA <i>TNF<math>\alpha</math></i>	8 (25,8%)	3	5

Tab. XVII. Obecność mRNA *IL-1* w strzemiączkach chorych na otosklerozę i w strzemiączkach z grupy kontrolnej w zależności od obecności RNA wirusa odry

RNA WIRUSA ODRY			
		obecny	nieobecny
<i>Grupa badana (n = 61)</i>			
mRNA <i>IL-1</i>	56 (91,8%)	46	10
<i>Grupa kontrolna (n = 31)</i>			
mRNA <i>IL-1</i>	6 (19,3%)	1	5

Tab. XVIII. Obecność mRNA *OPG* w strzemiączkach chorych na otosklerozę i w strzemiączkach z grupy kontrolnej w zależności od obecności RNA wirusa odry

RNA WIRUSA ODRY			
		obecny	nieobecny
<i>Grupa badana (n = 61)</i>			
mRNA <i>OPG</i>	23 (37,7%)	18	5
<i>Grupa kontrolna (n = 31)</i>			
mRNA <i>OPG</i>	23 (74,1%)	2	21

#### 4.4.3 Poziom ekspresji genów: *TNF $\alpha$* , *IL-1*, *OPG* zależnie od grupy

Ze względu na wykrycie RNA wirusa odry w strzemiączkach z grupy

kontrolnej sprawdzono czy poziom ekspresji genów: *TNF $\alpha$* , *IL-1* i *OPG* różni się istotnie od poziomu zerowego, tj. poziomu bazowego oznaczającego brak ekspresji genu w próbce. Analiza wykazała, że dla wszystkich strzemiączek z grupy kontrolnej poziom ekspresji genów nie różnił się istotnie w przypadku *TNF $\alpha$*  oraz *IL-1* ( $t < 1,96$ ), ale różnił się dla *OPG* ( $t(30) = 4,74$ ;  $p < 0,001$ ;  $d = 0,81$ ). Średni poziom ekspresji genu *OPG* w tej grupie wynosił 0,25 ( $SD = 0,30$ )\*.

W grupie strzemiączek ze zwłok z obecnym RNA wirusa ( $n = 3$ ) średni poziom ekspresji genów *TNF $\alpha$*  i *IL-1* wynosił 0, a poziom ekspresji genu *OPG* wynosił 0,33\*.

W grupie kontrolnej zbadano różnice w poziomie ekspresji badanych genów pomiędzy próbkami odro pozytywnymi a próbkami, w których nie wykryto RNA wirusa (odronegatywne). Analizy ujawniły, że strzemiączka te nie różniły się znacząco ( $t < 1,96$ ).

Dokonano porównania badanych grup (grupa kliniczna i kontrolna) pod względem poziomu ekspresji badanych genów, (tab. XIX).

Okazało się, że grupy różniły się w przypadku poziomu ekspresji wszystkich trzech genów. Poziom ekspresji genów *TNF $\alpha$*  i *IL-1* był znacząco wyższy w grupie klinicznej niż kontrolnej, odwrotnie było w przypadku *OPG*. Analiza wartości statystyki d Cohena wskazuje, że wielkości tych różnic były albo małe ( $d < 0,20$ ), albo średnie ( $d > 0,50$ ), (tab. XIX).

Tab. XIX. Poziom ekspresji badanych genów zależnie od grupy

---

\* Względny poziom mRNA badanych genów określano w odniesieniu do poziomu mRNA genu referencyjnego ( $\beta$ -aktyny).

	Grupa					
	Kliniczna		Kontrolna			
mRNA	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>t</i>	<i>d</i>
<i>TNF-α</i>	0,90	2,81	0,09	0,28	2,21*	0,28
<i>IL-1</i>	1,64	3,42	0,05	0,19	3,62**	0,46
<i>OPG</i>	0,04	0,12	0,25	0,30	3,87**	0,52

\* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$ . \*\*\* $p < 0,001$ .

M - średnia arytmetyczna; SD - odchylenie standardowe

#### 4.4.4 Związek między poziomem ekspresji genów: *TNFα*, *IL-1* i *OPG* w próbkach odropozytywnych

Zbadano czy w grupie klinicznej istnieje korelacja między wartościami poziomu ekspresji analizowanych genów, (tab. XX).

Ujawniono jedynie słaby pozytywny związek między poziomem ekspresji genów *TNFα* i *IL-1*. Związek między tymi genami a mRNA *OPG* był ujemny, ale wartości współczynników korelacji nie były znamienne statystycznie.

Tab.XX. Współczynniki korelacji  $r$  Pearsona w analizie związku między poziomem

ekspresji analizowanych genów oraz statystyki opisowe w próbkach odropozytywnych

						Przedział ufności średniej (95%)	
mRNA	1.	2.	3.	$M$	$SD$	dolny	górny
1. $TNF\alpha$	–	0,32*	-0,07	0,48	1,08	0,17	0,79
2. $IL-1$		–	-0,13	1,71	3,48	0,71	2,71
3. $OPG$			–	0,05	0,13	0,01	0,08

\* $p < 0,05$ .

Sprawdzono także czy poziom ekspresji genów w tej grupie ( $n=49$ ) istotnie różni się od zera. Analiza przeprowadzona za pomocą testu t-Studenta wykazały, że w przypadku każdego z genów poziom ekspresji był istotnie wyższy od zera ( $t > 1,96$ ,  $d > 0,25$ ).

#### 4.4.5 Poziom ekspresji genów: $OPG$ , $TNF\alpha$ i $IL-1$ w próbkach odropozytywnych zależnie od czasu trwania choroby

Ze względu na fakt, iż otosklerozę jest procesem dynamicznym, zbadano czy istnieje związek między poziomem ekspresji genów a czasem trwania procesu chorobowego.

Za pomocą testu  $t$  zbadano czy w istnieje związek między poziomem ekspresji genów a czasem trwania procesu chorobowego. Podzielono badaną próbę strzemiączek odropozytywnych ( $n = 49$ ) na dwie grupy. Podstawą tego podziału była mediana, której wartość wyniosła 7 lat. Do pierwszej grupy zaliczono osoby, u których objawy choroby trwały maksymalnie do 6 lat ( $n = 23$ ), natomiast do drugiej grupy włączono osoby, które były chore od 8 lat i dłużej ( $n = 24$ ). Z analizy wyłączono w ten sposób osoby,

których dane o czasie trwania procesu otosklerotycznego były równe medianie ( $n = 2$ ).

Wyniki porównań grup prezentuje tabela XXI.

Poziom ekspresji genów *TNF $\alpha$*  i *IL-1* był statystycznie wyższy w grupie osób z krótszym okresem od pojawienia się objawów choroby niż w grupie osób chorujących dłużej, choć wielkość tej różnicy jest niska.

Nie zaobserwowano różnic pomiędzy poziomem ekspresji genu *OPG* w obu grupach.

Tab. XXI. Związek między czasem trwania choroby a poziomem ekspresji analizowanych genów

	Grupa									
	Krótki czas choroby ( $\leq 6$ lat)				Długi czas choroby ( $\geq 8$ lat)					
			Przedział ufności (95%)				Przedział ufności (95%)			
mRNA	<i>M</i>	<i>SD</i>	dolny	górny	<i>M</i>	<i>SD</i>	dolny	górny	<i>t</i>	<i>d</i>
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	0,78	1,51	0,13	1,44	0,23	0,31	0,10	0,37	1,75*	0,13
<i>IL-1</i>	2,56	4,55	0,59	4,53	0,82	1,80	0,06	1,58	1,74*	0,12
<i>OPG</i>	0,03	0,09	0,00	0,07	0,06	0,16	0,00	0,12	0,62	0,04

\* $p < 0,05$  (test jednostronny).

#### 4.4.6 Związek między obecnością RNA wirusa odry, poziomem ekspresji genów *TNF $\alpha$* i *IL-1* a poziomem ekspresji genu *OPG*

Oceniono związek między poziomem ekspresji genu *TNF $\alpha$*  a *OPG* zależnie od obecności RNA wirusa odry (interakcja między mRNA *TNF $\alpha$*  a RNA wirusa).

Dokonano również oceny związku między poziomem ekspresji genu *IL-1* a poziomem mRNA *OPG* zależnie od obecności RNA wirusa odry (interakcja między



mRNA *IL-1* a RNA wirusa). Analizę przeprowadzono na wszystkich próbkach strzemiączek z grupy klinicznej ( $n = 61$ ). W tym celu wykonano wieloczynnikową hierarchiczną analizę regresji, (tab. XXII).

Nie ujawniono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy poziomem ekspresji genów *TNF $\alpha$*  a *OPG*, ani pomiędzy *IL-1* a *OPG*.

Oceniono, że poziom ekspresji genów: *TNF $\alpha$* , *IL-1* i *OPG* w strzemiączkach pobranych od osób cierpiących na otosklerozę nie zależy od obecności RNA wirusa odry ( $t < 1$ ).

Tab. XXII. Związek między obecnością RNA wirusa odry, poziomem ekspresji genów *TNF $\alpha$*  i *IL-1* a poziomem ekspresji genu *OPG* zbadany za pomocą hierarchicznej

analizy regresji

Zmienna	$\Delta R^{2a}$	$B^b$	$SE^c$	$\beta^d$	$t^e$
1. m RNA <i>TNF<math>\alpha</math></i>	0,02	-0,003	0,005	-0,07	0,50
2. m RNA <i>IL-1</i>		-0,004	0,004	-0,12	0,91
1. m RNA <i>TNF<math>\alpha</math></i>	0,03	-0,002	0,006	-0,04	0,77
2. m RNA <i>IL-1</i>		-0,004	0,004	-0,12	0,35
3. RNA wirusa		0,021	0,04	0,07	0,59
1. m RNA <i>TNF<math>\alpha</math></i>	0,03	-0,002	0,006	-0,04	0,77
2. m RNA <i>IL-1</i>		-0,004	0,011	-0,08	0,81
3. RNA wirusa		0,024	0,044	0,08	0,59
4. Interakcja mRNA <i>TNF<math>\alpha</math></i> i RNA wirusa		-0,004	0,048	-0,01	0,93
5. Interakcja mRNA <i>IL-1</i> i RNA wirusa		-0,002	0,012	-0,50	0,88

<sup>a</sup>Przyrost poziomu wyjaśniania (wariancji) *OPG*. <sup>b</sup>Niestandaryzowany współczynnik regresji. <sup>c</sup>Błąd standardowy. <sup>d</sup>Standaryzowany współczynnik regresji. <sup>e</sup>Wartość statystyki *t* wskazującej na istotność  $\beta$ .

#### 4.5 Związek między przebyłą odrą i szczepieniem a obecnością RNA wirusa odry w strzemiączkach

Zbadano związek między przebyłym zachorowaniem na odrę a obecnością RNA wirusa odry w strzemiączkach. Nie wykryto znamionnego statystycznie związku między tymi zmiennymi ( $\chi^2(1, 30) = 0,08$ ; *n.i.*;  $V = 0,05$ ), (tab. XXIII).

Uwzględniono tylko te osoby, które na pytanie o przebyłą odrę udzieliły odpowiedzi „tak” albo „nie”.

Tab. XXIII. Rozkład częstości występowania RNA wirusa odry w strzemiączkach zależnie od przebytego zachorowania na odrę

	RNA wirusa odry w strzemiączkach	
Przebyte zachorowanie na odrę	Obecne	Nieobecne
Tak	9	2
Nie	18	3

Nie wykryto znamionnego statystycznie związku między przebytem szczepieniem przeciwko odrze a obecnością wirusa odry w strzemiączkach ( $\chi^2(1, 30) = 4,19$ ; *n.i.*;  $V = 0,26$ ). Częstość występowania RNA wirusa odry w strzemiączkach niezależnie od szczepienia przeciwko odrze prezentuje tabela XXIV.

Uwzględniono tylko te osoby, które na pytanie o szczepienie udzieliły odpowiedzi „tak” albo „nie” oraz takie, które powinny być szczepione z racji urodzenia się po 1975 roku („raczej tak”).

W sytuacji braku szczepień w znaczącej liczbie strzemiączek był obecny RNA wirusa odry (37 vs. 8).

Tab. XXIV. Rozkład częstości występowania RNA wirusa odry w strzemiączkach niezależnie od przebytego szczepienia przeciwko odrze

	RNA wirusa odry w strzemiączkach	
Szczepienie przeciwko odrze	Występowała	Nie występowała
Tak	3	3
Raczej tak	9	1
Nie	37	8

## 5. OMÓWIENIE

Dla utrzymania prawidłowej homeostazy kostnej niezbędne jest zachowanie równowagi pomiędzy aktywnością osteoblastów (komórek kościotwórczych) i osteoklastów (komórek kościogubnych). Te dwa rodzaje komórek odpowiedzialne są za następujące po sobie procesy niszczenia i tworzenia kości. Zaburzenie tej równowagi może prowadzić do wystąpienia patologii układu kostnego. Nadprodukcja i nadmierna aktywność osteoklastów przejawia się wzrostem resorpcji kości i osteoporozą. Nieproduktywne wytwarzanie tych komórek bądź ich wadliwe działanie prowadzi do wzrostu tworzenia niepełnowartościowej kości czyli osteopetrozy. Rolę kontrolną i regulacyjną homeostazy kostnej pełni triada białek sygnałowych szlaku OPG-RANKL-RANK [112].

RANKL jest ligandem receptora aktywującego jądrowy czynnik kappa B (ang. *receptor activator for nuclear factor  $\kappa$ B ligand*), który należy do rodziny ligandów TNF (ang. *TNF ligand family members*). Czynnik ten jest aktywatorem procesu tworzenia dojrzałych osteoklastów. Jego wysoki poziom występuje na powierzchni osteoblastów, osteoklastów i komórek zrębu. RANKL produkowany jest przez komórki szpiku kostnego, fibroblasty, komórki nabłonkowe i śródbłonkowe oraz limfocyty T.

RANK - receptor aktywujący jądrowy czynnik kappa B (ang. *receptor activator for nuclear factor  $\kappa$ B*) jest członkiem podrodziny receptorów TNF (ang. *subfamily of TNF receptors*). Receptor ten jest również szeroko rozpowszechniony w tkankach, wytwarzają go komórki dendrytyczne, śródbłonkowe, fibroblasty, limfocyty B i T oraz osteoklasty. RANKL wiążąc się ze swoim funkcjonalnym receptorem RANK, stymuluje osteoklastogenezę, czyli przemianę prekursorów osteoklastów w formy dojrzałe oraz powoduje ich aktywację.

Osteoprotegeryna (OPG) jest glikoproteiną blokującą różnicowanie się

osteoklastów i resorpcję kości. Poprzez wiązanie się z białkiem RANKL, OPG jako jego receptor kompetycyjny uniemożliwia związanie się z receptorem RANK i tym samym zatrzymuje proces dojrzewania oraz aktywacji osteoklastów.

Czynniki osteotropowe, między innymi: IL-1, 1,25-(OH)D<sub>3</sub>, IL-11 i prostaglandyna E<sub>2</sub> indukują powstawanie osteoklastów oraz powodują wzrost ekspresji RANKL [75, 113-118].

Analiza epidemiologiczno-kliniczna danych naszych chorych wykazała, że wśród leczonych z otosklerozą dominowała płeć żeńska. W niniejszym materiale kobiety stanowiły 65,6% podczas gdy mężczyźni 34,4% badanej grupy. Stosunek kobiet do mężczyzn wynosił 1,9 : 1. Doniesienia innych autorów potwierdzają skądinąd, że kobiety chorują na otosklerozę 2x częściej niż mężczyźni [12, 25, 119-121]. Częstsze występowanie otosklerozy wśród kobiet może wskazywać na wpływ hormonów płciowych na rozwój tej choroby. Oddziaływanie to nie jest jednak jednoznaczne. Udowodniono, że estrogeny chronią kości przed niszczeniem poprzez hamowanie dojrzewania osteoklastów oraz indukcję ich apoptozy a także poprzez stymulację wydzielania OPG przez osteoblasty i obniżanie odpowiedzi osteoklastów na RANK [122]. Estrogeny obniżają również resorpcję kości poprzez hamowanie aktywności osteoklastów oraz hamowanie wydzielania cytokin takich jak IL-1, IL-6 i TNF $\alpha$  [123]. Niedobór w organizmie hormonów z tej grupy powoduje wzrost ekspresji RANKL na limfocytach i komórkach zrębu [124]. Z drugiej zaś strony estrogeny w połączeniu z progesteronem powodują hiperprolaktynemię, co wiąże się ze wzrostem procesu niszczenia kości. Wzrost wydzielania prolaktyny podczas ciąży i laktacji a także w stanach patologicznych aktywuje kaskadę czynników prowadzących do resorpcji kości, między innymi poprzez hamowanie funkcji osteoblastów. Prolaktyna

obniża produkcję OPG natomiast podwyższa poziom RANKL. Uważa się, że doustna antykoncepcja oraz hormonalna terapia zastępcza, zawierająca połączenie estrogenów z progesteronem może być czynnikiem ryzyka rozwoju otosklerozy i pogłębienia niedosłuchu w jej przebiegu [122].

Wśród badanych 40 kobiet trzy stosowały doustną antykoncepcję, a jedna hormonalną terapię zastępczą. Mała liczebność tej grupy uniemożliwiła porównanie jej z grupą kobiet niestosujących leków hormonalnych. Lippy i wsp. dokonali analizy wpływu ciąży na przebieg otosklerozy [cyt. wg 25]. Wśród badanych przez niego 180 kobiet, 137 było przynajmniej raz w ciąży a 43 nigdy nie rodziło. Autorzy porównali wyniki badań audiometrycznych obydwu grup kobiet i wykluczyli wpływ ciąż i ich ilości oraz wpływ karmienia piersią na pogorszenie słuchu w przebiegu otosklerozy [cyt. wg 25]. W grupie naszych pacjentek 88,5% było przynajmniej raz w ciąży a niemal połowa z nich co najmniej dwukrotnie. W naszych badaniach również nie stwierdzono zależności pomiędzy przebytą ciążą, ilością przebytych ciąż a stopniem ubytku słuchu i wartością rezerwy ślimakowej.

W analizowanej grupie chorych na otosklerozę nie wykazano wpływu płci na poziom niedosłuchu. Podobne obserwacje przedstawił Vartiainen [cyt. wg 119]. Przeanalizował on wyniki audiometrii tonalnej grupy 112 kobiet i 63 mężczyzn. Nie zanotował różnic w wartościach rezerwy ślimakowej między kobietami i mężczyznami aczkolwiek zaobserwował wyższą tendencję do pojawiania się niedosłuchu czuciowo-nerwowowego w grupie kobiet. Różnice te nie zależały od wieku badanych. Podobnie jak w naszym materiale, liczebność grup kobiet i mężczyzn nie była równa. Zatem po raz kolejny potwierdza się fakt, że kobiety chorują na otosklerozę dwukrotnie częściej.

W niniejszym materiale wiek chorych wahał się między 24 a 64 lata, a średnia

wieku wynosiła 43,5 roku. Okres od wystąpienia pierwszych objawów choroby do momentu operacji poprawiającej słuch wynosił średnio 9 lat. U najstarszego operowanego chorego (64 lata) problemy ze słuchem pojawiły się w 40-tym roku życia, a u najmłodszej pacjentki (24 lata) niedosłuch trwał 2 lata. U badanych chorych niedosłuch jako pierwszy objaw otosklerozy pojawiał się najczęściej w 3 dekadzie życia. Wyniki te są zgodne z obserwacjami prezentowanymi przez innych autorów [10, 125].

Oprócz niedosłuchu większość naszych pacjentów zgłaszała szумы uszne. Występowały one u 72,1% chorych. Do innych objawów należały okresowe zawroty głowy zgłaszane przez ponad połowę pacjentów. Kilka osób podawało występowanie stałego pisku w uszach.

Morawiec-Bajda i Durko wskazują w swoim opracowaniu na okresowe zawroty głowy u 12% badanych chorych na otosklerozę, Gros i wsp. stwierdzili je u 20,6%, Bozorg Grayeli u 9%, podczas gdy Trivelli i wsp. nie zaobserwowali takich objawów wśród swoich pacjentów [cyt. wg 45, cyt. wg 79, cyt. wg 125, cyt. wg 126].

Gros i wsp. podzielili badanych pacjentów, pod względem zaawansowania procesu otosklerotycznego, na 3 grupy. Każda z grup charakteryzowała się określoną fazą procesu otosklerotycznego. Podziału na fazy: spongiotyczną, fibrotyczną i sklerotyczną dokonali na podstawie obrazu histologicznego usuniętych fragmentów podstawy strzemiączek zmienionych otosklerotycznie. Jako stadium spongiotyczne określili oni fazę choroby, w której w obrazie mikroskopowym zmienionej tkanki widoczne są liczne komórki oraz zwiększona waskularyzacja. Stadium fibrotyczne to takie, w którym obserwuje się zmniejszenie liczby osteoblastów i rozsiane osteoklasty. Faza sklerotyczna jest formą nieaktywną, cechującą się zwiększoną mineralizacją i



zmniejszoną aktywnością komórek. Wśród analizowanych przez nich pacjentów na zawroty głowy najczęściej skarżyli się chorzy będący w trzeciej grupie zaawansowania histologicznego choroby [cyt. wg 125].

Wg Iyer'a i Gristwood'a obraz histopatologiczny zmienionych otosklerotycznie strzemiączek odpowiada obrazowi widzianemu w mikroskopie operacyjnym [cyt. wg 66]. W niniejszym opracowaniu ze względu na konieczność „oszczędzania” do badań molekularnych tak skąpej ilości materiału jakim jest suprastruktura strzemiączka i część jego płytki odstąpiono od jego oceny histologicznej. W analizie posłużono się stopniem unieruchomienia strzemiączka wg skali Portmanna [7]. Przeprowadzono analizę związku pomiędzy pojawieniem się zawrotów głowy u naszych pacjentów a stopniem zaawansowania procesu otosklerotycznego wg skali Portmanna. Nie zaobserwowano zależności pomiędzy występowaniem zawrotów głowy a zaawansowaniem otosklerozy.

Szumy uszne zgłaszane przez 44 badanych chorych występowały u 77,5% kobiet i 62% mężczyzn. Podobnych obserwacji wśród swoich pacjentów dokonali Gristwood i Venables. Wykazali oni, że grupie 1014 chorych na otosklerozę 65% z nich skarżyło się na przewlekły szum uszny w chorym uchu. Wśród badanych kobiet 69,7% z nich podało szumy uszne, podczas gdy wśród mężczyzn na szumy skarżyło się 56,1% z nich [cyt. wg 127]. Trivelli i wsp. z kolei podają w swoim opracowaniu występowanie szumów usznych jedynie u 7% badanych chorych na otosklerozę [cyt. wg 126]. W przeprowadzonej analizie związków pomiędzy występowaniem szumów usznych wśród naszych chorych a stopniem unieruchomienia strzemiączka oraz pomiędzy szumami a okresem od pojawienia się niedosłuchu nie zanotowano zależności. Takich związków nie zaobserwowali również Gristwood i Venables [cyt.

wg 127].

Wyniki wielu badań wskazują, że w patogenezie otosklerozy ogromną rolę pełni przewlekła stymulacja antygenowa wirusem odry w uchu środkowym wywołując wtórną odpowiedź układu odpornościowego. Szereg opracowań potwierdza obecność RNA wirusa odry w płytkach strzemiączek usuniętych od chorych na otosklerozę.

Pierwsze badania z wykorzystaniem metody PCR poprzedzonej odwrotną transkrypcją pojawiły się w latach 90-tych ubiegłego stulecia. Niedermeyer i Arnold a następnie McKenna i wsp. wykryli sekwencje nukleotydów wirusa odry w tkance otosklerotycznej przy użyciu metody RT-PCR [38, 43, 128]. Niedermeyer i Arnold początkowo opisywali obecność wirusa odry w 45% a w dalszych badaniach w ponad 90% badanych strzemiączek usuniętych od chorych na otosklerozę [ cyt. wg 43, cyt. wg 128]. Zbliżony wynik uzyskali McKenna i wsp. znajdując wirusa w 73% badanych kości skroniowych [cyt. wg 38].

Próby oceny wpływu obecności wirusa odry w strzemiączkach chorych na otosklerozę podjęli się również Bozorg Grayeli i wsp. [cyt. wg 45]. Autorzy ci nie stwierdzili jednak produktów amplifikacji właściwych dla wirusa odry we fragmentach strzemiączek pobranych od 28 osób. Dla uwierzytelnienia czy reakcja PCR przebiega prawidłowo, poza określaniem obecności RNA wirusa odry autorzy oceniali poziom transkryptu genu *GAPDH* (ang. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego). Jako geny referencyjne w reakcji PCR stosowane są między innymi *GAPDH* i *beta aktyna*. Gen referencyjny, inaczej gen metabolizmu podstawowego charakteryzuje się stałym, nieulegającym wpływom różnych czynników poziomem ekspresji we wszystkich komórkach organizmu [129]. Geny te służą potwierdzeniu, że w badanej próbce znajduje się RNA. Bozorg Grayeli i

wsp. nie znaleźli RNA wirusa odry w badanych strzemiączkach. Również nie we wszystkich badanych próbkach wykryli mRNA *GAPDH*. Transkrypt genu *GAPDH* stwierdzono tylko w 71% badanych fragmentach strzemiączek. Wynika z tego, że aż w 8 próbkach na 28 nie było RNA. Może to wynikać z błędów w izolacji RNA, lub jak podają autorzy spontanicznej degradacji RNA. W opracowaniu brakuje również informacji jak transportowano i przechowywano próbki z fragmentami strzemiączek a jak wiadomo prawidłowe warunki transportu i przechowywania próbek z RNA są kluczowe dla jego „przeżycia”. Stabilność RNA wirusa odry może być mniejsza od innych cząstek RNA znajdujących się w badanych próbkach z czego może wynikać fakt braku RNA wirusa odry przy obecności mRNA *GAPDH*. Kolejnym powodem niewykrycia wirusa w strzemiączkach chorych na otosklerozę może być niska czułość metody PCR, która w porównaniu z czułością PCR w czasie rzeczywistym jest kilkadziesiąt razy mniejsza.

Autorami szeregu cennych opracowań na temat patogenezы otosklerozы i wpływu wirusa odry na jej powstanie są Węgrzy, Karosi i wsp. Autorzy ci stosując metodę RT-PCR (początkowo z 59% skutecznością) wykryli RNA wirusa odry w strzemiączkach usuniętych od pacjentów cierpiących na otosklerozę [cyt. wg 44]. W kolejnym opracowaniu Karosi i wsp. wykazali 100% wykrywalność RNA wirusa odry w strzemiączkach z potwierdzeniem histologicznym otosklerozы. W płytkach strzemiączek z negatywnym histologicznym rozpoznaniem otosklerozы (27% unieruchomionych strzemiączek) autorzy nie znaleźli obecności wirusa [cyt. wg 67]. W kolejnym badaniu opublikowanym w 2005 roku autorzy stosując tę samą metodę RT-PCR wykryli RNA wirusa odry w 62,3% analizowanych płytek strzemiączek. Również 61% strzemiączek zawierało RNA wirusa odry w analizowanej próbce opublikowanej

w 2007 roku. W tych obu opracowaniach autorzy nie potwierdzili badaniem histologicznym czy unieruchomienie podstawy strzemiączka faktycznie powodowane jest przez otosklerozę czy inny proces patologiczny [cyt. wg 54, cyt. wg 133]. W obszernym opracowaniu z 2009 roku Karosi i wsp. zbadali 248 płytek strzemiączka pobranych od chorych z podejrzeniem otosklerozy. Próbkę te zostały przebadane histologicznie. Dodatni wynik potwierdzający otosklerozę uzyskali w 160 płytkach. W każdej z nich za pomocą RT-PCR zlokalizowano RNA wirusa odry [cyt. wg 33]. Ciekawym wydaje się być fakt, że aż 35% unieruchomionych strzemiączek nie było zmienionych otosklerotycznie. Istnieje przypuszczenie, że autorzy publikacji kierowali się zbyt rygorystycznymi wytycznymi w rozpoznawaniu histologicznym otosklerozy.

W naszym badaniu, w 49 strzemiączkach pobranych od chorych na otosklerozę wykryto RNA wirusa odry. 19,7% próbek było wolnych od cząstek wirusa. Ze względu na ograniczoną ilość materiału pobieranego podczas operacji oraz mając na uwadze publikację Iyer'a i Gristwood'a nie wykonywano badań histologicznych w usuniętych fragmentach strzemiączka [66]. W tym miejscu należy podkreślić, że w naszej Klinice obecnie nie wykonuje się zabiegów stapedektomii (usunięcia całego strzemiączka). Głównym powodem takiego postępowania są powikłania jakie mogą występować po całkowitym usunięciu płytki strzemiączka. Stapedotomia - częściowe usunięcie strzemiączka - ma na celu głównie poprawę słuchu chorego, bez narażania go na dodatkowe powikłania. Fragmenty strzemiączka - suprastruktura i część zmienionej chorobowo płytki, które pobierano podczas zabiegu stapedotomii są bardzo małych rozmiarów. Próbkę te, po badaniu histologicznym, nie wystarczyłyby na przeprowadzenie badania zawartości RNA wirusa odry oraz oznaczenie poziomu ekspresji genów: *TNF- $\alpha$* , *IL-1* i *OPG*.

Porównując wyniki niniejszej pracy, w których w 80,3% strzemiączek wykryto RNA wirusa odry - do wyników Karosiego i wsp. (100% wykrywalność RNA wirusa po histologicznym potwierdzeniu otosklerozy i około 60% bez rozpoznania histologicznego) - nasuwa się kilka wniosków. Po pierwsze: nie można z całą pewnością rozpoznać otosklerozy opierając się na badaniu przedoperacyjnym (wywiad, badanie otoskopowe, badanie audiometryczne) i na ocenie obrazu mikroskopowego. Po drugie: u części pacjentów, u których w strzemiączkach nie stwierdzono obecności RNA wirusa odry, otoskleroza może mieć podłoże genetyczne. Po trzecie: metoda PCR w czasie rzeczywistym jest znacznie bardziej precyzyjną i czulszą metodą od RT-PCR (80,3% vs 59-62,3%) w szacowaniu obecności struktur wirusa w strzemiączkach.

Podczas analizowania piśmiennictwa na temat otosklerozy dokonano ciekawego spostrzeżenia. W niektórych publikacjach Karosiego i wsp., w metodyce znaleziono informację, że w przeprowadzonych badaniach autorzy nie brali pod uwagę strzemiączek, których płytki zostały częściowo usunięte podczas zabiegu. Postępowanie takie wyjaśniali faktem pozostawienia w niszy owalnej przedniego lub tylnego bieguna płytki strzemiączka zajętego przez proces otosklerotyczny [62, 67]. W niniejszej pracy analizowano tylko i wyłącznie fragmenty strzemiączek pobieranych podczas zabiegu stapedotomii. Nie można stwierdzić jaką część ogniska otosklerotycznego usunięto razem z fragmentem płytki. W niektórych przypadkach część usuniętej płytki była bardzo niewielkich rozmiarów. Czy fragment takiej płytki zawierał ogniska otosklerozy trudno to stwierdzić. Być może ten fakt tłumaczy brak obecności wirusa odry w tych przypadkach. Pomimo tego uzyskano zbliżone do przedstawionych przez Karosiego i wsp. wyniki oznaczenia obecności RNA wirusa odry w strzemiączkach. Nasze rezultaty badań potwierdzają wyższość zastosowanej w

niniejszej analizie metody PCR w czasie rzeczywistym (kilkadziesiąt razy bardziej czuła) nad metodą RT-PCR. Ponadto, biorąc pod uwagę fakt, iż w niniejszej pracy większość materiału pobieranego podczas zabiegu stanowiła suprastruktura strzemiączka, nie można całkowicie odrzucić możliwości obecności RNA wirusa odry w suprastrukturze. Być może poza płytką, również w odnogach strzemiączka i w innych strukturach ucha środkowego znajdują się cząstki wirusa ale w mniejszej ilości, którą można oznaczyć tylko tak czułą metodą jak PCR w czasie rzeczywistym.

Porównując strzemiączka pobrane od chorych na otosklerozę ze strzemiączkami z grupy kontrolnej widać wyraźną dysproporcję w wynikach badania obecności RNA wirusa odry w obu grupach. I tak w 80,3% strzemiączek, które zostały usunięte podczas zabiegu poprawiającego słuch (grupa badana) stwierdzono RNA wirusa odry, podczas gdy w strzemiączkach pobranych ze zwłok (grupa kontrolna) wirus był obecny w 9,6%. Różnica w występowaniu RNA wirusa odry pomiędzy obiema grupami jest istotna statystycznie. Obecność cząstek wirusa w trzech strzemiączkach z grupy kontrolnej można wyjaśnić ewentualnym pojawieniem się błędu laboratoryjnego. Jednak nie można wykluczyć sytuacji, w której osoba zmarła, od której pobrano materiał do badań przechorowała odrę a cząsteczki wirusa przetrwały w uchu środkowym. Wyłączając założenie, że strzemiączka z grupy kontrolnej zostały pobrane od osób zdrowych, zmarłych śmiercią nagłą, nie można z całą pewnością stwierdzić czy w uchu, z którego pobrano materiał nie toczył się proces otosklerotyczny zlokalizowany poza okienkiem owalnym i podstawą strzemiączka. Jak podano we wstępie, istnieje postać histologiczna otosklerozy, przebiegająca bez unieruchomienia płytki strzemiączka, występująca 10 razy częściej niż postać kliniczna [cyt. wg 65].

Nasuwać się kolejne pytania dotyczące etiologii wirusowej otosklerozy. Jeśli wirus odry ma wpływ na powstanie otosklerozy, to jakie znaczenie ma szczepienie przeciwko odrze? W 1975 roku do kalendarza szczepień ochronnych w Polsce wprowadzono obowiązek szczepienia przeciwko odrze. Efektem szczepień był szybki spadek zapadalności na odrę, pomimo tzw. wyrównawczej epidemii w roku 1998, podczas której zachorowało 2255 osób i jedna zmarła [cyt. wg 134].

Podczas przeprowadzonych przez nas analiz nie zaobserwowano związku pomiędzy przebytym zachorowaniem na odrę a obecnością RNA wirusa w strzemiączkach. Nie zanotowano również znamienego statystycznie związku pomiędzy przebytym szczepieniem przeciwko odrze a obecnością RNA wirusa. Jednakże RNA wirusa odry częściej odnajdywany był w strzemiączkach pobranych od osób nieszczepionych (37 osób) niż u zaszczepionych (3 osoby).

Według Arnolda i wsp., po wprowadzeniu szczepienia przeciw odrze w Niemczech (1974 r.) istotnie spadła zapadalność na otosklerozę w grupie wiekowej do 25 roku życia. Podniósł się również wiek chorych na otosklerozę. Spadek ten jest wyraźniejszy wśród mężczyzn niż u kobiet, a stosunek kobiet do mężczyzn chorujących na otosklerozę w większości przeanalizowanych opracowań wynosi około 2 : 1. Przyczyną, jak próbowano wykazać, może być odmienna reakcja immunologiczna u kobiet. Na świecie na skutek komplikacji związanych z zachorowaniem na odrę częściej umierają kobiety. Więcej powikłań poszczepiennych obserwuje się również u dziewczynek niż u chłopców [130 - 132].

Nasuwa się kolejne pytanie a mianowicie dlaczego pomimo szczepień przeciwko odrze nie wyeliminowano zachorowań na otosklerozę u osób do 25 roku życia? Wyjaśnieniem może być fakt, iż wirus odry nie jest jedynym czynnikiem

wywołującym tę chorobę. Ważną rolę odgrywa również podłoże genetyczne otosklerozy. Wyniki badań epidemiologicznych wskazują, że w 50 do 70% przypadków choroba ta występuje rodzinie [1]. Kolejną przyczyną może być to, że z różnych powodów nie wszyscy chorzy na otosklerozę byli rzeczywiście szczepieni przeciwko odrze. Trzeba również wziąć pod uwagę, że około 15% szczepionych nie uzyskuje odporności po pierwszej dawce szczepienia dlatego istotne jest drugie szczepienie wykonywane do 15 roku życia. Z różnych powodów nie zawsze możliwe jest przyjęcie drugiej dawki szczepionki [cyt. wg 134].

Jak zaznaczono we wstępie, przewlekła stymulacja wirusowa wywołuje wtórną reakcję układu odpornościowego, w której główną rolę pełnią komórki NK (ang. *natural killers*), komórki cytotoksyczne aktywowane przez limfokiny, komórki CD8+, granulocyty i makrofagi [42, 53, 54]. Komórki układu immunologicznego działają poprzez wydzielanie cytokin prozapalnych, do których między innymi należą TNF $\alpha$  i IL-1. Czynniki te powodują wzrost napływu niedojrzałych form osteoklastów ze szpiku kostnego do krwi a następnie do ucha środkowego, gdzie toczy się proces zapalny. Proces dojrzewania osteoklastów jest aktywowany poprzez połączenie liganda RANKL ze swoim receptorem RANK. TNF $\alpha$  stymuluje ekspresję RANKL na komórkach zrębu i osteoblastach ale także, niezależnie od RANKL, samodzielnie powoduje przekształcenie się preosteoklastów w dojrzałe komórki. Zarówno prekursorzy jak i dojrzałe formy osteoklastów również mają zdolność wydzielania mediatorów, w tym TNF $\alpha$ , co dodatkowo nasila interakcje z innymi komórkami układu immunologicznego [135]. Wzrost ekspresji RANKL na komórkach szpiku i osteoblastach powoduje także interleukina-1 stymulując aktywację osteoklastów. TNF $\alpha$  i RANKL działając synergistycznie wywołują wzrost poziomu RANK w prekursorach osteoklastów. TNF $\alpha$



i IL-1 przeciwnie do osteoprotegeryny wywierają efekt antyapoptotyczny na osteoklasty przez co przedłużają długość ich życia i zwiększenie resorpcji kości [124].

Kolejnym celem niniejszej pracy było określenie poziomu ekspresji genów *TNF $\alpha$* , *IL-1* i *OPG* w strzemiączkach usuniętych od chorych na otosklerozę oraz próba oceny ich faktycznej roli w patogenezie tej choroby. Dane z piśmiennictwa zagranicznego wskazują na wysoki poziom czynnika martwicy nowotworów w fazie aktywnej otosklerozy, kiedy zachodzi przebudowa otoczki kostnej błędnie [54, 136-138].

Karosi i wsp., których wyniki badań omawiane były w niniejszej pracy już wcześniej, reprezentują wiodący ośrodek naukowy specjalizujący się między innymi w studiach nad patogenezą otosklerozy. Przy użyciu metody RT-PCR, autorzy ci oznaczyli obecność mRNA *TNF $\alpha$*  i zbadali jego związek z obecnością RNA wirusa odry w ognisku otosklerotycznym [cyt. wg 54]. Ekspresję transkryptu genu *TNF $\alpha$*  wykryli w 88 (88,8%) na 99 próbek otosklerotycznych z obecnym RNA wirusa odry i w 8 próbkach bez RNA wirusa. Stosując metodę RT-PCR, której celem jest jakościowe oznaczenie poziomu ekspresji genów, w/w mogli dokonać tylko prostej analizy swoich wyników na zasadzie braku lub obecności ekspresji genu. Autorzy ci stwierdzili dodatnią korelację pomiędzy obecnością RNA wirusa odry a obecnością mRNA *TNF $\alpha$*  w płytkach strzemiączek usuniętych od chorych na otosklerozę. W kolejnej publikacji porównując natomiast wyniki z powyższej pracy z wynikiem oznaczenia mRNA *OPG*, ustalili obecność mRNA *OPG* w 10 na 99 próbek odropozytywnych i w 47 na 55 strzemiączek bez obecności wirusa [cyt. wg 56]. Na tej podstawie Karosi i wsp. odnotowali ujemną korelację pomiędzy obecnością mRNA *OPG* i *TNF $\alpha$* .

W naszym modelu doświadczalnym osiągnięto wyniki zbliżone do rezultatów

osiągniętych przez Karosiego i wsp. (81,6% vs 88,8%). Dodatkowo oznaczono też poziom ekspresji transkryptu genu *IL-1*. W przypadku mRNA *OPG* wyniki nieznacznie się różnią (36,7% w naszym badaniu vs 10,1% u Karosiego i wsp.). Stosując jakościową metodę analizy Karosiego i wsp. w naszych wynikach zaobserwowano również dodatni związek pomiędzy obecnością mRNA *TNFα* a obecnością RNA wirusa odry. Co więcej, zanotowano także dodatni związek pomiędzy obecnością mRNA *IL-1* a obecnością RNA wirusa odry. W badanym materiale mniej zaś było odropozytywnych strzemiączek z obecnym mRNA *OPG*.

Odwrotna sytuacja miała miejsce w strzemiączkach nieobjętych procesem otosklerotycznym, pobranych ze zwłok. Obecność mRNA *OPG* zaobserwowano w większości próbek (74,1%), podczas gdy obecność mRNA *TNFα* i *IL-1* wykazano w kilku strzemiączkach. Wykonana analiza statystyczna wykazała, że obecność mRNA *TNFα* oraz *IL-1* w strzemiączkach z grupy kontrolnej nie była istotna statystycznie, w przypadku zaś genu *OPG* była wyraźna i istotna statystycznie.

W niniejszej pracy zastosowano metodę PCR w czasie rzeczywistym, która oprócz jakościowej analizy materiału genetycznego („zwykły” PCR) pozwala na oznaczenie ilości badanego materiału jaki rzeczywiście wyjściowo znajdował się w badanej próbce. Analizując faktyczny poziom ekspresji badanych genów zbadano czy istnieje związek pomiędzy poziomem ekspresji genów *TNFα*, *IL-1* i *OPG* a obecnością RNA wirusa odry w strzemiączkach zmienionych otosklerotycznie. Okazało się, że poziom ekspresji genów *TNFα* i *IL-1* w strzemiączkach pobranych od osób cierpiących na otosklerozę nie zależy od obecności RNA wirusa odry. Istotniejszym jednak wydaje się być fakt samej obecności mRNA tych cytokin bądź ich brak w ognisku otosklerotycznym.

Następnie porównano poziom ekspresji badanych genów w grupie klinicznej i kontrolnej. Okazało się, że różnił się pomiędzy obiema grupami. I tak, poziom ekspresji transkryptów genów *TNFα* i *IL-1* był wyższy w grupie klinicznej niż w grupie kontrolnej, zaś odwrotnie było w przypadku *OPG*.

Nieobecność mRNA *osteoprotegeryny* przy równoczesnej obecności mRNA *TNFα* i *IL-1* w strzemiączkach usuniętych od chorych na otosklerozę wskazuje na zahamowanie jej wydzielania spowodowane wzrostem poziomu tych cytokin prozapalnych. Potwierdzeniem tego jest wynik oznaczenia obecności badanych genów w strzemiączkach pobranych od osób zdrowych, które zmarły śmiercią nagłą, a mianowicie występowanie mRNA *OPG* w większości strzemiączek przy braku obecności mRNA *IL-1* i *TNFα*.

Ponadto zbadano czy w grupie klinicznej istnieje korelacja między poziomem ekspresji genów: *OPG* a *IL-1* i *TNFα*. Ujawniono jedynie słaby pozytywny związek między poziomem ekspresji genów *TNFα* i *IL-1*. Stwierdzono ujemny związek między poziomem ekspresji tych genów a poziomem ekspresji *OPG*, ale wartości współczynników korelacji nie są znamienne statystycznie.

Badania przeprowadzone przez Zehnder i wsp. sugerują, że w warunkach prawidłowych poziom *OPG* jest bardzo wysoki w przychłonce, skąd przenika ona do otoczki kostnej błędnika, gdzie hamuje resorpcję kości [cyt. wg 61]. *TNFα* wydaje się być czynnikiem, który obniża ekspresję genu *OPG* i podwyższa sekrecję *RANK* i *RANKL*, co w rezultacie powoduje zwiększoną aktywację osteoklastów oraz zmniejszenie apoptozy osteoklastów i osteolizę [56].

Istotne jest to, że w otosklerozie poziom czynników osteoklastogenezy jakimi są między innymi *TNFα* i *IL-1* jest zależny od fazy procesu przebudowy. Procesy

zachodzące w kości w otosklerozie są procesami dynamicznymi. W różnych okresach choroby faza aktywna przechodzi w nieaktywną. Z drugiej zaś strony istnieje również możliwość, że obie fazy mogą istnieć równolegle w różnych częściach ogniska otosklerotycznego.

Identyfikacja mRNA *TNF $\alpha$*  i *IL-1* dowodzi aktywności procesu otosklerotycznego w badanej kości [54]. Brak mRNA tych cytokin w ognisku otosklerotycznym wskazuje na wygaszenie aktywności komórkowej i fazę nieaktywną otosklerozy. Z kolei ich nieobecność w strzemiączkach z grupy kontrolnej potwierdza, że nie ma w nich procesu zapalnego.

Biorąc pod uwagę te czynniki, w niniejszej pracy zbadano czy istnieje związek pomiędzy okresem trwania objawów choroby a poziomem ekspresji genów: *TNF $\alpha$* , *IL-1* i *OPG* w grupie odropozytywnej. Analizowaną grupę odropozytywną, w której strzemiączkach znaleziono RNA wirusa odry, podzielono na dwie podgrupy z krótszym i dłuższym okresem trwania objawów otosklerozy ( $\leq 6$  lat vs  $\geq 8$  lat).

I tak, zanotowano znamienne wyższy poziom ekspresji mRNA *TNF $\alpha$*  i *IL-1* w grupie osób z krótkim okresem od wystąpienia objawów choroby od poziomu ekspresji tych genów w grupie osób chorujących dłużej. Nie zaobserwowano natomiast różnic pomiędzy poziomem ekspresji mRNA *OPG* w obu podgrupach odropozytywnych. Z tych obserwacji wynika, że poziom cytokin prozapalnych *TNF $\alpha$*  i *IL-1* rzeczywiście podnosi się w przypadku aktywnego procesu otosklerotycznego i obniża się wraz z czasem trwania choroby. Natomiast poziom osteoprotegeryny nie podlega istotnym wahaniom i nie podwyższa się po przejściu otosklerozy w fazę nieaktywną.

Kolejnym problemem, który próbowano w tej pracy wyjaśnić była kwestia wykazania zależności pomiędzy stopniem zaawansowania procesu otosklerotycznego

mierzonego w skali Portmanna a głębokością niedosłuchu. W literaturze nie znalazłam opracowania, które opisywałoby taki związek.

Większość strzemiączek naszych pacjentów została zakwalifikowana do 4 stopnia w skali Portmanna. W stopniu 4 strzemiączko jest całkowicie unieruchomione w okienku owalnym a jego płytka jest w całości pogrubiała. O ile wśród badanych pacjentów nie było chorych w stopniach 1 i 2, to w przypadku kilku osób ich stopień zaawansowania otosklerozy oceniono na 3 i 3a zaś kilka osób zakwalifikowano do 5 stopnia w skali Portmanna.

Jedynе znalezione opracowanie, w którym posłużono się skalą Portmanna do oceny zaawansowania procesu otosklerotycznego jest autorstwa Bozorg Grayeli i wsp. [cyt. wg 45]. W czasie zabiegu operacyjnego autorzy ci ocenili strzemiączka na stopień, odpowiednio 2 w 31%, 3 w 37%, i 4 w 31% w skali Portmanna. Stopnia 1 i 5 wśród swoich pacjentów nie odnotowali. Różnice w wynikach mierzonych wg skali Portmanna pomiędzy niniejszą pracą a przedstawioną przez Bozorg Grayeli i wsp. najpewniej wynikają z różnego okresu trwania objawów choroby wśród badanych pacjentów. Autorzy ci podają 5 lat jako średni czas od wystąpienia niedosłuchu u swoich chorych do momentu operacji, podczas gdy u naszych pacjentów objawy manifestowały się średnio przez 9 lat. U jednej z badanych przez nas pacjentek niedosłuch trwał 40 lat. Miało to swoje odzwierciedlenie w skali Portmanna, gdyż stopień unieruchomienia jej strzemiączka oceniono jako 5. Natomiast w badaniu Bozorg Grayeli i wsp., najdłuższy okres od wystąpienia pierwszych objawów otosklerozy u chorego wynosił 17 lat. Autorzy nie zbadali czy istnieje związek pomiędzy okresem trwania objawów choroby a jej zaawansowaniem wg skali Portmanna.

Gierek i wsp. w swoim opracowaniu dotyczącym obliteracyjnej postaci otosklerozy podsumowują wyniki badań audiometrycznych wykonanych u 53 pacjentów [cyt. wg 10]. Postać obliteracyjna odpowiada 5 stopniowi w skali Portmanna. Spośród badanych i leczonych w ciągu 10 lat 605 chorych na otosklerozę, autorzy wyłonili 53 pacjentów z postacią obliteracyjną, u których niedosłuch trwał średnio 9,3 lata. Nasze badanie objęło 7 chorych, u których stopień unieruchomienia strzemiączka w skali Portmanna oceniono jako 5. Pacjenci ci zgłaszali niedosłuch trwający średnio 15 lat. W obu pracach zanotowano związek pomiędzy okresem trwania objawów otosklerozy a zaawansowaniem procesu otosklerotycznego. Różnica 9,3 vs 15 lat prawdopodobnie wynika z dysproporcji zawartej w liczbie osób objętych porównaniem.

Gierek i wsp. porównali badania słuchu i obecność szumów usznych pacjentów z 5 stopniem zaawansowania procesu otosklerotycznego z wynikami badań pacjentów, u których nie stwierdzono najwyższego stadium zaawansowania choroby (grupa porównawcza). Autorzy odnotowali, że nie ma związku pomiędzy występowaniem szumów usznych w obu grupach. W niniejszym opracowaniu również nie zaobserwowano zależności pomiędzy występowaniem szumów a stopniem unieruchomienia strzemiączka w niszy owalnej. Zarówno w niniejszej pracy jak i w opracowaniu Gierek i wsp. nie stwierdzono zależności pomiędzy zaawansowaniem procesu otosklerotycznego a wartością rezerwy ślimakowej. Dodatkowo autorzy w/w zaobserwowali zależności pomiędzy wynikiem badania przewodnictwa kostnego i powietrznego u chorych z postacią obliteracyjną a tożsamymi badaniami u chorych z grupy porównawczej. I tak, w grupie badanej średnie wartości progowe przewodnictwa powietrznego były o 10 dB wyższe ( $61$  vs  $51 \pm 2$  dB HL) niż w grupie, w której nie

stwierdzono postaci obliteracyjnej otosklerozy. Dla przewodnictwa kostnego różniły się one o 8 dB ( $27$  vs  $19 \pm 2$  dB HL). Wynika z tego, że różnice są znaczące, więc poziom ubytku słuchu zależy od stopnia zaawansowania otosklerozy [cyt. wg 10].

Nasze badania nie odnotowują związku pomiędzy stopniem głębokości niedosłuchu a zaawansowaniem procesu otosklerotycznego. Brak tej zależności można tłumaczyć faktem, iż zdecydowaną większość strzemiączek ( $n=38$ ) u badanych pacjentów zakwalifikowano do 4 stadium w skali Portmanna. Pozostałe 23 strzemiączka oceniono w stopniach, odpowiednio 3 ( $n=8$ ), 3a ( $n=8$ ) i 5 ( $n=7$ ). Taka rozbieżność w liczebności grup osób, których strzemiączka zostały zakwalifikowane do odpowiedniego stopnia zaawansowania, nie pozwala na pokazanie różnic w badaniach audiometrycznych. W konsekwencji nie wykryto związku pomiędzy stopniem zaawansowania procesu otosklerotycznego ocenianego w skali Portmanna a stopniem głębokości niedosłuchu u pacjentów objętych niniejszym badaniem.

Interesujące wyniki badań audiologicznych w powiązaniu z danymi epidemiologicznymi u 1064 pacjentów cierpiących na otosklerozę przedstawili Topsakal i wsp [cyt. wg 139]. Średnia wieku chorych (44 lata) oraz stosunek kobiet do mężczyzn ( $1,8 : 1$ ) objętych badaniem była podobna do przedstawionych w naszej pracy. Poziom głębokości niedosłuchu w badaniu Topsakal'a i wsp. nie zależy od płci. Takiego związku nie stwierdzono również w naszym opracowaniu. Topsakal i wsp. sprawdzili czy istnieje zależność pomiędzy wiekiem badanych pacjentów a stopniem ubytku słuchu. Zaobserwowali oni wyraźną tendencję do podwyższania się progu przewodnictwa powietrznego średnio o 0,45 dB na rok życia pacjenta a przewodnictwa kostnego średnio o 0,37 dB na rok życia pacjenta [cyt. wg 139].

W niniejszym materiale również zbadano związek pomiędzy stopniem ubytku

słuchu a wiekiem badanych chorych. Jednakże i tu nie odnotowano takiej zależności.

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy słuch u pacjentów z otosklerozą poprawia tylko leczenie operacyjne. Jak dotąd nie znaleziono możliwości przeciwdziałania wystąpieniu tej choroby i skutecznego jej leczenia.

Na świecie przeprowadzane są liczne badania dotyczące etiologii i patogenezы otosklerozы od momentu ustalenia, iż to unieruchomienie strzemiączka było przyczyną głuchoty u chorego. Być może rezultaty niniejszej pracy i ich interpretacja przyczynią się do lepszego zrozumienia istoty tej choroby i będą one stanowić inspirację dla innych badaczy do zastosowania najnowszych dostępnych metod molekularnych w poszukiwaniu etiopatogenezy otosklerozы. Wyniki analizы molekularnej ognisk otosklerotycznych w uchu być mogą być pomocne do opracowania strategii zapobiegania i leczenia tej choroby. Obiecujące, jak się wydaje rezultaty niniejszej pracy mogą być jednocześnie zachętą do kontynuowania badań chorych z otosklerozą w celu dalszego poszukiwania jej mechanizmów i przyczyn.

## **6. WNIOSKI**

1. Wykazano obecność RNA wirusa odry w strzemiączkach chorych na otosklerozę (zarówno w płytce strzemiączka jak i suprastrukturze), co może świadczyć



o jego roli w patogenezie tej choroby.

2. Poziom ekspresji genów *TNF $\alpha$*  i *IL-1* w strzemiączkach chorych na otosklerozę jest wyższy niż poziom ekspresji genu *OPG*. W strzemiączkach pobranych od osób zdrowych, zmarłych śmiercią nagłą poziom ekspresji genu *OPG* jest wyższy niż poziom ekspresji genów *TNF $\alpha$*  i *IL-1*.

a. Nie zaobserwowano istotnej statystycznie korelacji pomiędzy obecnością mRNA *OPG* a obecnością mRNA *TNF $\alpha$*  i *IL-1*, aczkolwiek odnotowano brak mRNA *OPG* w większości strzemiączek chorych na otosklerozę przy obecności mRNA cytokin prozapalnych (*TNF $\alpha$*  i *IL-1*), co może świadczyć o hamowaniu ekspresji genu *OPG* przez te cytokiny.

b. Obecność mRNA *TNF $\alpha$*  i *IL-1* w próbkach odropozytywnych jest wynikiem stymulacji antygenowej wirusem odry i może być wykładnikiem aktywności procesu zapalnego w ognisku otosklerotycznym a także wskazuje na toczący się w nich proces przebudowy kostnej.

3. Stopień zaawansowania procesu otosklerotycznego w niszy okienka owalnego nie ma wpływu na głębokość niedosłuchu.

## 7. STRESZCZENIE

Jedną z częstszych przyczyn niedosłuchu u ludzi jest otoskleroza, która jest chorobą błędnika kostnego. Etiopatogeneza otosklerozy wciąż jest niejasna. W mechanizmie powstawania tej choroby znaczną rolę odgrywają czynniki genetyczne,

autoimmunologiczne, hormonalne i środowiskowe, zaburzenia metabolizmu kości oraz przetrwała infekcja wirusem odry.

Celem pracy było wykazanie obecności RNA wirusa odry oraz ocena poziomu ekspresji genów: *czynnika martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ )*, *interleukiny -1 (IL-1)* i *osteoprotegeryny (OPG)* w tkance kostnej strzemiączka u chorych na otosklerozę jak również ocena związku pomiędzy głębokością niedosłuchu u chorych na otosklerozę a stopniem zaawansowania procesu otosklerotycznego.

Przeprowadzono prospektywne badanie 61 chorych na otosklerozę leczonych chirurgicznie w Klinice Otolaryngologii GUMed w okresie od 01.12. 2007 r. do 01.01.2011 r.

U chorych wykonano badanie otolaryngologiczne, próby stroikowe oraz badania audiometryczne. Wszyscy badani pacjenci zostali poddani leczeniu operacyjnemu, które miało na celu poprawę słuchu. Podczas zabiegu na strzemiączku u chorych usuwano część płytki i suprastrukturę, które następnie użyto do badań molekularnych. Grupę kontrolną stanowiło 31 strzemiączek pobranych ze zwłok osób zmarłych śmiercią nagłą (Zakład Medycyny Sądowej GUMed).

Obecność RNA wirusa odry oraz poziom ekspresji genów: *TNF- $\alpha$* , *IL-1* i *OPG* w usuniętych fragmentach kostnych oznaczano przy zastosowaniu metody PCR w czasie rzeczywistym (Zakład Medycyny Molekularnej GUMed).

Stopień zaawansowania procesu otosklerotycznego w uchu środkowym oceniano według klasyfikacji Portmanna.

Kobiety stanowiły większość badanych (40 vs 21). Średnia wieku chorych wynosiła 43,5 lat. U większości chorych stwierdzono umiarkowany niedosłuch. U ponad połowy pacjentów (62,3%) wykazano 4 stopień zaawansowania klinicznego (wg

skali Portmanna). W przeprowadzonych badaniach nie zaobserwowano związku pomiędzy głębokością niedosłuchu a stopniem zaawansowania procesu otosklerotycznego.

RNA wirusa odry wykryto w strzemiączkach 49 chorych na otosklerozę (80,3%). Wśród nich mRNA *TNFα* wykryto w 40 strzemiączkach (81,6%), mRNA *IL-1* w 46 strzemiączkach (93,8%). Tylko w 18 strzemiączkach (36,7%) odropozytywnych stwierdzono mRNA *OPG*. W próbkach pobranych ze zwłok mRNA *OPG* stwierdzono w 23 strzemiączkach (74,1%), podczas gdy mRNA *TNFα* i *IL-1* wykryto odpowiednio w 8 (25,8%) i w 6 (19,3%) strzemiączkach. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy poziomem ekspresji genów *TNFα* i *IL-1* a poziomem ekspresji genu *OPG* w próbkach odropozytywnych.

Występowanie RNA wirusa odry w strzemiączkach może wskazywać na jego rolę w patogenezie otosklerozy. Obecność mRNA *TNFα* i *IL-1* w próbkach odropozytywnych jest wynikiem stymulacji antygenowej wirusem odry i może być wykładnikiem aktywności procesu zapalnego w ognisku otosklerotycznym. Brak mRNA *OPG* w większości strzemiączek chorych na otosklerozę przy obecności mRNA cytokin prozapalnych świadczy o przebudowie kostnej zachodzącej w strzemiączkach.

Analiza nie wykazała zależności pomiędzy poziomem ubytku słuchu u chorych na otosklerozę a stopniem zaawansowania zmian otosklerotycznych w niszy okienka owalnego.

Być może rezultaty badań niniejszej pracy i ich interpretacja przyczyniły się do lepszego poznania istoty tej choroby. Wyniki przedstawionej analizy molekularnej ognisk otosklerotycznych w uchu byłyby wówczas pomocne w dalszych pracach nad

strategią zapobiegania i leczenia tej choroby.

## 8. SUMMARY

Otosclerosis, the disease of the human otic capsule, is a frequent cause of hearing loss. The etiopathogenesis of otosclerosis still remains unclear. Genetic factors and persistent measles virus infections play a crucial role in the pathomechanism of this disease.

The aim of the study was to investigate the presence of the measles virus and to assess the level of the: *tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ )*, *Interleukin-1 (IL-1)* and *Osteoprotegerin (OPG)* genes expression in the bone tissue of the stapes of patients suffering from otosclerosis. Another purpose was to estimate the association between the level of the hearing loss and the type of otosclerotic fixations according to Portmann Classification. 61 patients suffering from otosclerosis treated surgically in the Department of Otolaryngology, Medical University in Gdańsk (MUG) were analyzed prospectively. The otolaryngological preoperative examination consisted of detailed anamnesis and audiological studies. Each patient underwent surgery on the stapes in order to improve the hearing. During the surgery the superstructure and the part of the stapes' footplate was removed and taken into further molecular analysis. Control group consisted of 31 stapes taken from persons who died of a sudden cause (Department of Forensic Medicine, MUG).

The investigation of the presence of the measles virus presence and the assessment of the level of transcripts for genes: *TNF $\alpha$* , *IL-1* and *OPG* was performed using Real-time Polymerase Chain Reaction.

The material consisted of 40 female and 21 male patients. The median age of all patients was 43,5. In the majority of the patients moderate hearing loss was found. More than half of all cases was classified as type 4 according to Portmann Classification. The presence of the measles virus RNA was shown in 49 stapes (80,3%) from otosclerosis patients. *TNF $\alpha$*  mRNA was detected in 40 virus-positive stapes

(81,6%), *IL-1* mRNA in 46 virus-positive stapes (93,8%). *OPG* mRNA was detectable in only 18 virus-positive stapes (36,7%). In the specimens from cadavers *OPG* mRNA was detectable in 23 stapes (74,1%), *TNF $\alpha$*  mRNA in 8 stapes (25,8%) and *IL-1* mRNA in 6 stapes (19,3%). There was no correlation between the level of transcripts for genes: *TNF $\alpha$* , *IL-1* and *OPG* in the measles virus positive samples.

The detection of the measles virus RNA in the stapes may indicate its role in the pathogenesis of otosclerosis. The presence of the *TNF $\alpha$*  and *IL-1* mRNA in the virus-positive stapes is the result of viral antigen stimulation and may be the marker of the inflammatory activity in the otosclerotic focus.

The lack of *OPG* mRNA and the presence of mRNA of proinflammatory cytokines in the majority of the stapes in patients with otosclerosis shows the bone remodeling process which occurs in the stapes.

The analysis showed no correlation between the level of hearing loss in patients with otosclerosis and the stage of otosclerotic changes in the oval window niche.

The results of this study and their interpretation can contribute to a better understanding of the nature of otosclerosis. The results of molecular analysis of otosclerotic foci in the ear can be used to develop strategies to prevent and treat this disease.

## 9. PIŚMIENICTWO

1. Markou K, Goudakos J. An overview of the etiology of otosclerosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009; 266: 25-35.
2. Mudry A. First descriptions of the ankylosis of the stapes. *Otol Neurotol* 2010; 31: 1177.
3. Politzer A. Die typische Otoklerose [W] *Lehrbuch Der Ohrenheilkunde Für Praktische Ärzte Und Studierende*. Verlag Von Ferdinand Enke 1908; 293 –304.
4. Mudry A. Adam Politzer (1835-1920) and the Description of Otosclerosis. *Otol Neurotol* 2006; 27: 276-281.
5. Shea JJ. A personal history of stapedectomy. *Am J Otol* 1998; 19: 2-12.
6. Bajaj Y, Uppal S, Bhatti I, Coatesworth AP. Otosclerosis 3: the surgical management of otosclerosis. *Int J Clin Pract* 2010; 64: 505–510.
7. Tos M, red. Otosclerosis. *Surgical Solutions for Conductive Hearing Loss*. Stuttgart: George Thieme Verlag, 2000; 83-94.
8. Uppal S, Bajaj Y, Rustom I, Coatesworth AP. Otosclerosis 1: the aetiopathogenesis of otosclerosis. *Int J Clin Pract* 2009; 63: 1526 – 1530.
9. Niemczyk K, Bruzgielewicz A, Bartoszewicz R, Pierchała K. Naturalny rozwój otosklerozy – od szumu do głuchoty. *Pol Merkuriusz Lek* 2005; 19: 475-477.
10. Gierek T, Witkowska M, Zborowska-Bielska D, Klimczak- Gołąb L. Ocena wyników stapidotomii u chorych z obliteracyjną postacią otosklerozy. *Otolaryngol Pol* 2006; 60: 377-383.
11. Thys M, Schrauwen I, Vanderstraeten K, Dieltjens N, Fransen E, Ealy M i wsp. Detection of Rare Nonsynonymous Variants in TGF $\beta$ 1 in Otosclerosis Patients. *Ann Hum Genet* 2009; 73: 171-175

12. Moumoulidis I, Axon P, Baguley D, Reid E. A review on the genetics of otosclerosis. *Clin Otolaryngol* 2007; 32: 239-247.
13. Chole RA, McKenna M. Pathophysiology of otosclerosis. *Otol Neurotol* 2001; 22: 249-257.
14. Karosi T, Jókay I, Kónya J, Petkó M, Szabó LZ, Sziklai I. Expression of measles virus receptors in otosclerotic, non-otosclerotic and in normal stapes footplates. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007; 264: 607–613.
15. Niedermeyer HP, Arnold W. Otosclerosis and measles virus – Association or Causation. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2008; 70: 63-70.
16. Min J-Y, Chung W-H, Lee WY, Cho YS, Hong SH, Kim HJ I wsp. Otosclerosis: Incidence of positive findings on temporal bone computed tomography (TBCT) and audiometric correlation in Korean patients. *Auris Nasus Larynx* 2009; 37: 23-28.
17. Ohtani I, Baba Y, Suzuki T, Suzuki Ch, Kano M. Why Is Otosclerosis of Low Prevalence in Japanese? *Otol Neurotol* 2003; 24:377–381.
18. Horiguchi S, Onchi Y, Tsunoda C. Studies on clinical otosclerosis in Japan [in Japanese]. *J Otolaryngol Jpn* 1955;58:1289–94.
19. McKenna MJ, Kristiansen AG, Bartley ML, Rogus JJ, Haines JL. Association of COL1A1 and Otosclerosis. Evidence for a shared genetic etiology with mild osteogenesis imperfecta. *Am J Otol* 1998; 19: 604-610.
20. Arnold W, Busch R, Arnold A, Ritscher B, Neiss A, Niedermeyer HP. The influence of measles vaccination on the incidence of otosclerosis in Germany. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007; 264: 741-748.
21. Stankovic KM, McKenna MJ. Current research in otosclerosis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 14: 347-351.



22. Morrison AW. Genetic factors in otosclerosis. *Ann R Coll Surg Engl* 1967; 41: 202-237.
23. Tod H. *Diseases of the Ear*. Oxford University Press 1907.
24. Szymański M, Gołabek W, Siwiec H. Zmiana obrazu otosklerozy w dwóch dziesięcioleciach. *Otolaryngol Pol* 2002; 56: 557-559.
25. Lippy WH, Berenholz LP, Schuring AG, Burkey JM. Does pregnancy affect otosclerosis? *Laryngoscope* 2005; 115: 1833-1836.
26. Niedermeyer HP, Arnold W. Etiopathogenesis of otosclerosis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2002; 64:114-119.
27. Gierek T, Klimczak-Gołab L. Wyniki odległe w otosklerozie. *Otolaryngol Pol* 2006; 5: 653-661.
28. Szymiec E, Golusiński W, Banaszewski J, Kopeć T, Szyfter W. Otoskleroza wieku młodzieńczego. *Otolaryngol Pol* 1999; 53: 474-475.
29. Namysłowski G, Ścierski W, Mrówka-Kata K. Stapedotomia w leczeniu otosklerozy wieku dziecięcego. *Otolaryngol Pol* 2001; 55: 521-524.
30. Namysłowski G, Ścierski W, Trybalska G, Mrówka-Kata K, Orecka B, Gac B. Leczenie otosklerozy u dzieci. *Pol Merkuriusz Lek* 2005; 19: 331-332.
31. Krzeska-Malinowska I, Niemczyk K, Bartoszewicz R. Odległe wyniki stapedektomii wykonywanych u dzieci. *Pol Merkuriusz Lek* 2005; 19: 420-422.
32. Chorow O, Aleszczyk, Marcul D, Maksymowicz A, Jucewicz T. Zastosowanie rejestracji wywołanych potencjałów słuchowych pnia mózgu podczas stapedoplastyki pod narkozą u dzieci. *Otolaryngol Pol* 2007; 61:188-191.
33. Sziklai I, Batta TJ, Karosi T. Otosclerosis: an organ – specific inflammatory disease with sensorineural hearing loss. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009; 266: 1711-1718.

34. Chodynicky S, Olszewska E. Otokleryza. Śliwińska - Kowalska M. red. Audiologia kliniczna. Wyd. 1. Łódź; Mediton, 2005; 237-248.
35. Menger DJ, Tange RA. The aetiology of otosclerosis: a review of the literature. Clin Otolaryngol 2002; 28:112-120.
36. Kurihara N, Zhou H, Reddy SV, Palacios VG, Subler MA, Dempster, DW i wsp. Expression of Measles Virus Nucleocapsid Protein in Osteoclasts Induces Paget's Disease-Like Bone Lesions in Mice. J Bone Miner Res 2006; 21: 446-455.
37. Kurihara N, Hiruma Y, Yamana K, Michou L, Rousseau C, Morissette J, Galson DL, Teramachi J, Zhou H, Dempster DW, Windle JJ, Brown JP, Roodman GD. Contributions of the Measles Virus Nucleocapsid Gene and the SQSTM1/p62P392L Mutation to Paget's Disease. Cell Metabolism 2011; 13: 23-34.
38. McKenna MJ, Kristiansen AG, Haines J, Polymerase Chain Reaction Amplification of a Measles Virus Sequence from Human Temporal Bone Sections with Active Otosclerosis. Am J Otol 1996; 17: 827-830.
39. Mills BG, Singer FR. Nuclear inclusions in Paget's disease of bone. Science 1976; 194: 201-202.
40. Mills BG, Singer FR, Weiner LP. Evidence for both respiratory syncytial virus and measles virus antigens in the osteoclasts of patients with Paget's disease of bone. Clin Orthop 1984; 183: 303-311.
41. McKenna MJ, Mills BG, Galey FR, Linthicum FH. Filamentous structures morphologically similar to viral nucleocapsids in otosclerotic lesions in two patients. Am J Otol 1986; 7: 25-28.

42. Niedermeyer HP, Arnold W, Neubert WJ, Sedlmeier R. Persistent measles virus infection as a possible cause of otosclerosis: State of the art. *Ear Nose Throat J* 2000; 79: 552-561.
43. Niedermeyer HP, Arnold W. Otosclerosis: a measles virus associated inflammatory disease. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1995;115: 300–303.
44. Karosi T, Kónya J, Szabó LZ, Sziklai I. Measles Virus Prevalence in Otosclerotic Stapes Footplate Samples. *Otol Neurotol* 2004; 24: 451-456.
45. Bozorg Grayeli A, Palmer P, Tran Ba Huy P, Soudant J, Sterkers O, Lebon P i wsp. No evidence of measles virus in stapes samples from patients with otosclerosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2655–2660.
46. Kessler JR, Kremer JR, Muller CP. Interplay of measles virus with early induced cytokines reveals different wild type phenotypes. *Virus Res* 2011; 155: 195-202.
47. Yanagi Y, Takeda M, Ohno S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 2006; 87: 2767-2779.
48. Rima BK, Duprex WP. Molecular mechanism of measles virus persistence. *Virus Res* 2005; 111: 132-147.
49. Griffin DE. Measles virus. Knipe DM, Howley PM, DE Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, red. *Fields Virology* (3rd ed.), Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001 s. 1401–1441.
50. Sato H, Honma R, Yoneda M, Miura R, Tsukiyama-Kohara K, Ikeda F I wsp. Measles virus induces cell-type specific changes in gene expression. *Virology* 2008; 375: 321-330.
51. Schneider-Schaulies J, Dunster LM, Schneider-Schaulies S, Meulen V. Pathogenetic aspects of measles virus infections. *Vet Microbiol* 1995; 44: 113-125.

52. McKenna MJ. Measles, Mumps, and Sensorineural Hearing Loss. *Ann N Y Acad Sc* 1997; 830: 291-298.
53. Arnold W, Niedermeyer HP, Lehn N, Neubert W, Hofler H. Measles virus in otosclerosis and the specific immune response of the inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1996; 116: 705-709.
54. Karosi T, Kónya J, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J, Szalmás A, Sziklai I. Codetection of Measles Virus and Tumor Necrosis Factor-Alpha mRNA in Otosclerotic Stapes Footplates. *Laryngoscope* 2005; 115: 1291–1297.
55. Chodyncki S. Interleukina 1 beta i TNF alfa w surowicy chorych z otoskleroza *Otolaryngol Pol* 1992; 46: 388-391.
56. Karosi T, Kónya J, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J, Szalmás A i wsp. Detection of Osteoprotegerin and TNF-alpha mRNA in Ankylotic Stapes Footplates in Connection With Measles Virus Positivity. *Laryngoscope* 2006; 116: 1427-1433.
57. Smirnova MG, Kiselev SL, Gnuchev NV, Birchall JP, Pearson JP. Role of the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, interleukin-6 and interleukin-8 in the pathogenesis of the otitis media with effusion. *Eur Cytokine Netw* 2002; 13: 161-172.
58. Rifas L. Bone and Cytokines: Beyond IL-1, IL-6 and TNF- alfa. *Calcif Tissue Int* 1999; 64: 1-7.
59. Saidenberg Kermanac'h N, Bessis N, Cohen-Solal M, De Vernejoul MC, Boissier MC. Osteoprotegerin and inflammation. *Eur Cytokine Netw*. 2002; 13: 144–153.
60. Simonet WS, Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell*, 1997; 89: 309–319.

61. Zehnder AF, Kristiansen AG, Adams JC, Merchant SN, McKenna MJ. Osteoprotegerin in the Inner Ear May Inhibit Bone Remodeling in the Otic Capsule. *Laryngoscope* 2005; 115: 172–177.
62. Karosi T, Csomor P, Szalmas A, Konya J, Petko M, Sziklai I. Osteoprotegerin expression and sensitivity in otosclerosis with different histological activity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011; 268: 357–365.
63. Boyce BF, Li P, Yao Z, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM I wsp. TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J Med* 2005; 54: 127–131.
64. Cureoglu S, Schachern PA, Ferlito A, Rinaldo A, Tsuprun V, Paparella M. Otosclerosis: etiopathogenesis and histopathology. *Am J Otolaryngol* 2006; 27: 334-340.
65. Schuknecht HF, Barber W. Histologic variants in otosclerosis. *Laryngoscope* 1985; 95: 1307–17.
66. Iyer PV, Gristwood RE. Histopathology of the stapes in otosclerosis. *Pathology* 1984; 16: 30-8.
67. Karosi T, Konya J, Petko M, Sziklai I. Histologic otosclerosis is associated with the presence of measles virus in the stapes footplate. *Otol Neurotol* 2005; 26: 1128-1133.
68. Guild SR, Histologic otosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1944; 53: 246-266.
69. Weber M. Otosklerose und Umbau der Labyrinthcapsel Leipzig: Peoschel and Trepte; 1935.
70. Nowe' V , Verstreken M, Wuyts FL, Van de Heyning P, De Schepper AM, Parizel PM. Enhancement of the Otic Capsule in Active Retrofenestral Otosclerosis. *Otol Neurotol* 2004; 25: 633-634.

71. Kochanek K. Diagnostyka narządu słuchu. Janczewski G. red. Otorynolaryngologia praktyczna. Wyd.I Gdańsk: Via Medica; 2007; s.12-25.
72. Zhu M-M, Sha Y, Zhuang P-Y, Olszewski AE, Jiang J-Q, Xu J-H I wsp. Relationship between high-resolution computed tomography densitometry and audiometry in otosclerosis. *Auris Nasus Larynx* 2010; 37: 669-675.
73. Bozorg Grayeli BA, Saint Yrieix C, Imauchi Y, Cyna-Gorse F, Ferrary E, Sterkers O. Temporal Bone Density Measurements Using CT in Otosclerosis. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 2004; 124: 1136-1140.
74. Berrettini S, Ravecca F, Volterrai D, Neri E, Forli F. Imaging Evaluation in Otosclerosis: Single Photon Emission Computed Tomography and Computed Tomography. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2010; 119: 215-224.
75. Potocka M, Mionskowski T, Kuczkowski J. Etiopatogeneza otosklerozy. *Forum Medycyny Rodzinnej* 2010, 4: 281–286.
76. Arnold W, Sedlmeier R, Wiest I, Neubert WJ, Niedermeyer HP. Progress in basic research of otosclerosis. *Otolaryngol Pol* 2000; 54: 281-283
77. Kierzek A. Dziewiętnastowieczni lekarze wobec otosklerozy. *Adv Clin Exp Med* 2000; 9: 203-206.
78. Kierzek A. Usiłowania dziewiętnastowiecznych lekarzy leczenia otosklerozy. *Adv Clin Exp Med* 2000; 9: 207-209.
79. Morawiec-Bajda A, Durko T. Zawroty głowy i obiektywne objawy przedsionkowe w komputerowej ocenie ENG u chorych na otosklerozę i po operacjach strzemiączka. *Otolaryngol Pol* 2000; 54: 415-421.
80. Konopka W, Zalewski P, Olszewski J. Wczesna ocena zrozumiałości mowy u chorych po stapedektomii. *Otolaryngol Pol* 2000; 54: 161-166
81. Krzywdzińska M. Ocena wyników operacyjnego leczenia otosklerozy różnymi metodami w Katedrze i i Klinice Oto-Ryno-Laryngologii II Wydziału

- Lekarskiego Akademii Medycznej w Warszawie w latach 1972-1992. Otolaryngol Pol 2001; 55: 343-344.
82. Gołąbek W, Szymański M, Siwiec H, Kłos A. Powikłania trzech metod stapedektomii. Otolaryngol Pol 2001; 55: 593-597
83. Krzywdzińska M, Kukwa A, Siemińska J. Ocena wyników słuchowych u chorych na otosklerozę leczoną operacyjnie różnymi metodami. Otolaryngol Pol 2002; 56: 181-188.
84. Składzień J, Trąbka-Zawicki P, Tomaszewska R. Ocena biologicznej tolerancji protezki strzemiennia. Otolaryngol Pol 2002; 56: 687-688.
85. Skarżyński H, Miszka K, Zawadzki R, Mrówka MJ, Młotkowska-Klimek P, Wysocki J i wsp. Wpływ krwawień śródoperacyjnych na wyniki słuchowe po stapedotomiach. Audiofonologia 2002; 22: 21-25.
86. Gierek T. Niepowodzenia, powikłania i sposoby postępowania w operacjach otosklerozy. Otolaryngol Pol 2002; 56: 227-230.
87. Olszewska E, Chodyncki S, Łazarczyk B. Wyniki leczenia operacyjnego otosklerozy. Otolaryngol Pol 2002, 56: 479-482.
88. Skarżyński H, Mrówka M, Młotkowska-Klimek P, Sitarz L, Wysocki J, Skarżyńska B. Stapedotomia w zaawansowanej otosklerozie i tympanosklerozie. Audiofonologia 2003; 24: 43-51.
89. Skarżyński H, Mrówka M, Młotkowska-Klimek P, Sitarz L, Wysocki J, Skarżyńska B. Stapedotomia u chorych z małą rezerwą słuchową. Audiofonologia 2003; 24: 37-41.
90. Szymański M, Siwiec H, Gołąbek W. Ocena wyników stapedektomii za pomocą Glasgow Benefit Plot. Otolaryngol Pol 2003; 57: 403-406.
91. Szymański M. Otoskleroza - diagnostyka i postępowanie. Magazyn ORL 2004.

92. Gierek T, Smółka W, Zbrowska-Bielska D, Klimczak-Gołąb L, Majzel K.  
Ocena pomiarów otoemisji akustycznej produktów zniekształceń nieliniowych ślimaka (DPOAE) po stapedotomii. *Otolaryngol Pol* 2004; 58: 817-820
93. Gierek T, Klimczak-Gołąb L, Zbrowska-Bielska D. 30 lat chirurgii strzemiączka. *Otolaryngol Pol* 2004; 58: 61-67.
94. Kozok A. Wczesna i późna ocena wyników leczenia operacyjnego otosklerozy w materiale własnym. *Otolaryngol Pol* 2004; 58: 687-689
95. Gierek T, Klimczak-Gołąb L. Wyniki odległe leczenia chirurgicznego otosklerozy – Seria ponad 1000 pacjentów. *Pol Merkuriusz Lek* 2005; 19: 480-481.
96. Kozok A, Olszewski J, Pietkiewicz P. Ocena wyników leczenia operacyjnego otosklerozy w zależności od metody przedstawiania danych czynnościowych. *Otorynolaryngologia* 2005; 4: 195-198.
97. Konarska A. Odmienne warunki anatomiczne w jamie bebenkowej u chorych na otosklerozę. *Otolaryngologia Pol* 2005 59: 843-848.
98. Wielgosz R, Mroczkowski E. Długoletnie wyniki po operacjach otosklerozy techniką stapedektomii częściowej według Heermanna. *Otolaryngol Pol* 2006; 60: 907-910.
99. Mędrecki D. Przydatność rekonstrukcji 3D w diagnostyce i leczeniu otosklerozy -doświadczenia własne. *Pol Przegl Radiol* 2007; 72: 203-203.
100. Gierek T, Klimczak-Gołąb L. Wyniki leczenia chirurgicznego otosklerozy - seria 1527 przypadków. *Otorynolaryngologia* 2007; 6: 110-114
101. Szymański M. Stapedotomia za pomocą lasera CO<sub>2</sub>. *Otolaryngol Pol* 2007; 61: 463-467.



102. Durko M, Durko T, Pajor A, Stańczyk R, Pietruszewska W, Starska K i wsp. Retrospektywna analiza przypadków reoperacji w stapedotomiach i stapedektomiach - doświadczenia własne. *Otolaryngol Pol* 2008; 62: 468-470.
103. Durko M, Pajor A, Jankowski A, Stańczyk R, Józefowicz-Korczyńska M, Pietruszewska W i wsp. Wpływ rodzaju protezki strzemiączka na stopień poprawy słuchu w chirurgii strzemiączka - analiza retrospektywna 350 przypadków. *Otolaryngol Pol* 2008; 62: 480-482
104. Gierek T, Klimczak-Gołąb L, Witkowska M, Majzel K, Zbrowska-Bielska D, Paluch J, Ślaska-Kaspera A. Reoperacje w otosklerozie. *Otolaryngol Pol* 2009; 63: 8-11.
105. Jankowski A, Durko T, Pajor A, Durko M. Subiektywna śródoperacyjna poprawa słuchu u chorych po stapedotomiach w porównaniu z wynikiem kontrolnego badania słuchu w audiometrii tonalnej progowej. *Otolaryngol Pol* 2010; 64: 296-298.
106. Konarska A. Izotopowe badania aktywności przebudowy kości strzemiączka w otosklerozie *Otolaryngol Pol* 1997; 51: 87-94.
107. Konarska A. Zawartość fluorków i wapnia w kości strzemiączka w otosklerozie. *Otolaryngol Pol* 1997; 51: 183-190.
108. Farahani RM, Nooranipour M. Anatomy and anthropometry of human stapes. *Am J Otolaryngol* 2006; 29: 42-47.
109. Kuliwaba JS, Fazzalari NL., Findlay DM. Stability of RNA isolated from human trabecular bone at post-mortem and surgery. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1740: 1-11.
110. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.

111. Schalk JAC, de Vries CGJCA, Jongen PMJM. Potency estimation of measles, mumps and rubella trivalent vaccines with quantitative PCR infectivity assay. *Biologicals* 2005; 33: 71-79.
112. Kuczkowski J, Sakowicz-Burkiewicz M, Iżycka-Świeszewska E. Expression of the receptor activator for nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in chronic otitis media. *Am J Otolaryngol* 2010; 31: 404-409.
113. Karosi T, Szekanecz Z, Sziklai I. Otosclerosis: An autoimmune disease? *Autoimmun Rev* 2009; 9: 95-101.
114. Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 9 –18.
115. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 2007; 9
116. Wittrant Y, Theoleyre S, Chipoy C, Padrines M, Blanchard F, Heymann D, Redini F. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1704: 49 – 57.
117. Theoleyre S, Wittrant Y, Kwan Tat S, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 457–475.
118. Zdzisińska B, Kandefer-Szerszeń M. Rola RANK/RANKL i OPG w szpiczaku plazmocytowym. *Postepy Hig Med Dosw* 2006; 60: 471-482.
119. Vartiainen E. Sex differences in patients with hearing impairments caused by otosclerosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999; 256:431–433.
120. Schrauwen I, Van Camp G. The Etiology of Otosclerosis: A Combination of Genes and Environment. *Laryngoscope* 2010; 120: 1195-1202.

121. Shin YJ, Fraysse B, Deguine O, Cognard C, Charlet JP, Sevely A. Sensorineural hearing loss and otosclerosis. A clinical and radiologic study of 437 cases. *Acta Oto Laryngol* 2001; 121: 200 – 204.
122. Horner KC. The effect of sex hormones on bone metabolism of the otic capsule – an overview *Hear Res* 2009; 252: 56-60.
123. Imauchi Y, Lainé P, Sterkers O, Ferrary E, Bozorg Grayeli A. Effect of 17beta-Estradiol on Diastrophic Dysplasia Sulfate Transporter Activity in Otosclerotic Bone Cell Cultures and SaOS-2 cells. *Acta Otolaryngol* 2004; 124: 890-895.
124. Pacifici R. Estrogen deficiency, T cells and bone loss. *Cell Immunol* 2008; 252: 68–80.
125. Gros A, Vatovec J, Šereg-Bahar M. Histologic Changes on Stapedial Footplate in Otosclerosis Correlations Between Histologic Activity and Clinical Findings. *Otol Neurotol* 2003; 24: 43–47.
126. Trivelli M, D’Ascanio L, Pappacena M, Greco F, Salvinelli F. Air- and bone-conducted Vestibular Evoked Myogenic Potentials (VEMPs) in otosclerosis: recordings before and after stapes surgery. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2010; 30: 5-10.
127. Gristwood RE, Venables WN. Otosclerosis and chronic tinnitus. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003; 112: 398-403.
128. Niedermeyer HP, Arnold W, Neubert WJ, Hofler H. Evidence of measles virus RNA in otosclerotic tissue. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1994; 56: 130-132.
129. Romanowski T, Markiewicz A, Bednarz N, Bielawski K. Geny metabolizmu podstawowego jako geny referencyjne w ilościowym oznaczaniu

- ekspresji genów metodą real-time PCR. *Postępy Hig Med Dosw* 2007; 61: 500-51.
130. Arnold W, Busch R, Arnold A, Ritscher B, Neiss A, Niedermeyer HP. The influence of measles vaccination on the incidence of otosclerosis in Germany. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007; 264: 741–748.
131. Niedermeyer HP, Arnold W, Schwub D, Busch R, Wiest I, Sedlmeier R. Shift of the distribution of age in patients with otosclerosis. *Acta Otolaryngol* 2001; 121: 197-199.
132. Niedermeyer HP, Häusler R, Schwub D, Neuner N, Busch R, Arnold W. Evidence of increased average age of patients with otosclerosis. *Adv Otorhinolaryngol* 2007; 65: 17-24.
133. Karosi T, Konya J, Szaba LZ, Sziklai I. Measles virus prevalence in otosclerotic foci. *Adv Otorhinolaryngol* 2007; 65: 93-106.
134. Państwowy Inspektorat Sanitarny, Główny Inspektorat Sanitarny. ODRA. [www.pis.gov.pl](http://www.pis.gov.pl).
135. Fuller K, Murphy Ch, Kirstein B, Fox SW, Chambers TJ. TNF $\alpha$  potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology* 2002; 143: 1108-1118.
136. Karosi T, Jókay I, Kónya J, Petkó M, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J, Sziklai I. Activated osteoclasts with CD51/61 expression in otosclerosis. *Laryngoscope* 2006; 116: 1478-1484.
137. Karosi T, Sziklai I. Etiopathogenesis of otosclerosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010; 267: 1337-1349.
138. Csomor P, Sziklai I, Liktó B, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J i wsp. Otosclerosis: Disturbed balance between cell survival and apoptosis. *Otol Neurotol* 2010; 31: 867-874.

139. Topsakal V, Fransen E, Schmerber S, Declau F, Yung M, Gordts F i wsp.  
Audiometric analyses confirm a cochlear component, disproportional to age, in  
stapedial otosclerosis Otol Neurotol 2006; 27: 781-787.

## SPIS RYCIN

Ryc. 1. Genom wirusa odry.....	11
Ryc. 2. Wiek chorych z uwzględnieniem płci.....	32
Ryc. 3. Częstość występowania ciąży wśród badanych pacjentek.....	33
Ryc. 4. Rozkład liczebności kategorii niedosłuchu zależnie od strony operowanej.....	35
Ryc. 5. Przewodnictwo powietrzne i kostne po stronie operowanej (ucho lewe).....	36
Ryc. 6. Przewodnictwo powietrzne i kostne po stronie operowanej (ucho prawe).....	37
Ryc. 7. Rezerwa ślimakowa po stronie chorej.....	37
Ryc. 8. Rozkład stopni unieruchomienia strzemiączka (wg Portmanna).....	38
Ryc. 9. Przykładowe wyniki reakcji amplifikacji RNA wirusa odry, PCR w czasie rzeczywistym.....	95
Ryc. 10 Przykładowe wyniki reakcji amplifikacji transkryptu genu <i>TNFα</i> wraz z genem referencyjnym, PCR w czasie rzeczywistym.....	96
Ryc. 11 Przykładowe wyniki reakcji amplifikacji transkryptu genu <i>IL-1</i> wraz z genem referencyjnym, PCR w czasie rzeczywistym.....	97
Ryc. 12. Przykładowe wyniki reakcji amplifikacji transkryptu genu <i>OPG</i> wraz z genem referencyjnym, PCR w czasie rzeczywistym.....	98
Ryc. 13. Strzemiączko usunięte podczas stapedektomii.....	99
Ryc. 14. Wielkość strzemiączka (moneta 1 - groszowa).....	99
Ryc. 15. Suprastruktura strzemiączka usuniętego podczas stapedotomii (moneta 1 -groszowa).....	100
Ryc. 16. Obraz śródoperacyjny ucha środkowego chorej z otosklerozą. Widoczne są: odnoga długa kowadełka, nerw twarzowy, mięsień strzemiączkowy, strzemiączko oraz płytka strzemiączka (mikroskop operacyjny x16).....	100

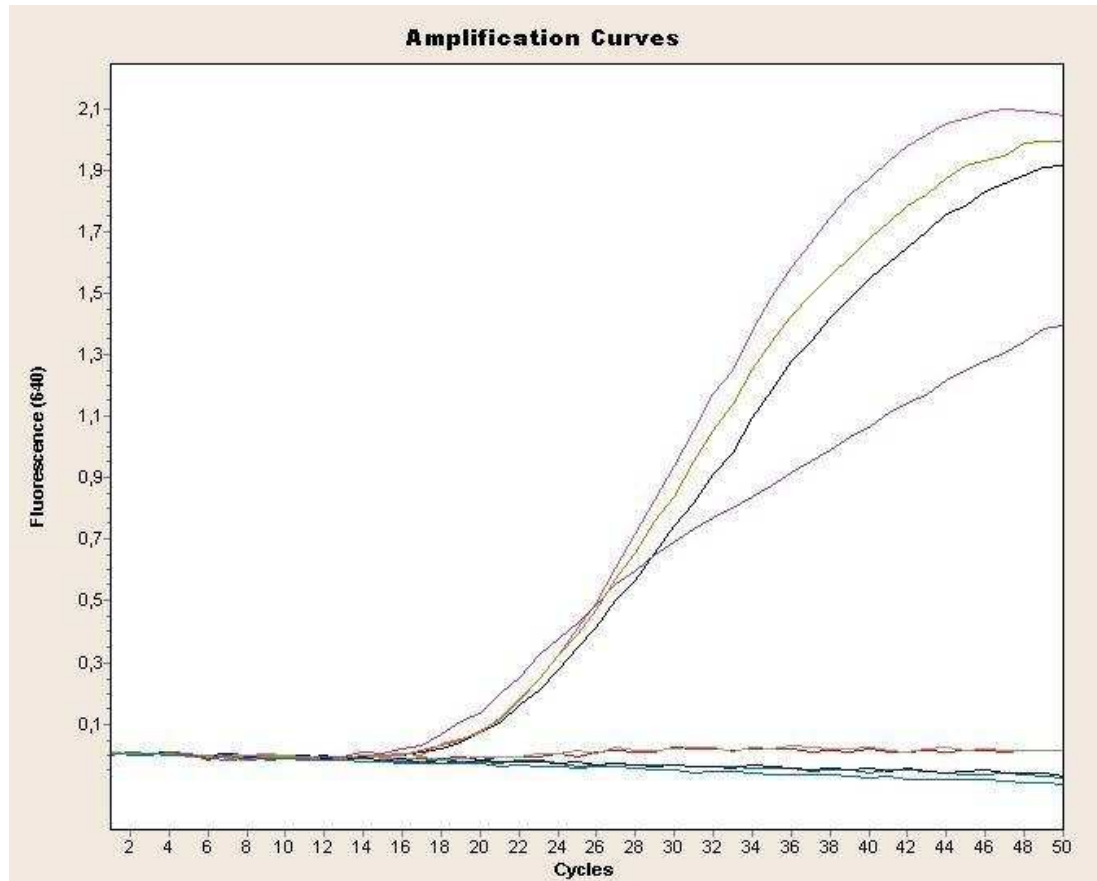
## SPIS TABEL

Tab. I. Lokalizacja ognisk otosklerotycznych w obrazie tomografii komputerowej.....	15
Tab. II. Podział ubytków słuchu w zależności od wielkości niedosłuchu wg Kochanka.....	22
Tab. III. Stadia unieruchomienia strzemiączka w niszy owalnej wg Portmanna.....	23
Tab. IV. Sekwencje primerów i sond w reakcji Real-time PCR amplifikacji mRNA <i>IL-1</i> , <i>OPG</i> i <i>TNF-α</i> .....	27
Tab. V. Sekwencje primerów i sond w reakcji Real-time PCR amplifikacji wirusa odry.....	28
Tab. VI. Występowanie niedosłuchu w rodzinie.....	32
Tab. VII. Występowanie szumów usznych zależnie od płci.....	33
Tab. VIII. Występowanie pisków w uszach zależnie od płci.....	34
Tab. IX. Występowanie zawrotów głowy zależnie od płci.....	34
Tab. X. Średni ubytek słuchu dla poszczególnych częstotliwości oraz wybranych grup częstotliwości w zależności od strony operowanej.....	36
Tab. XI. Wyniki tympanometrii.....	39
Tab. XII. Wyniki próby Webera.....	39
Tab. XIII. Wyniki próby Rinneho.....	40
Tab. XIV. Wyniki próby Gellégo.....	40
Tab. XV. Rozkład częstości występowania RNA wirusa odry w strzemiączkach chorych na otosklerozę i z grupy kontrolnej.....	43
Tab. XVI. Obecność mRNA <i>TNFα</i> w strzemiączkach chorych na otosklerozę i w strzemiączkach z grupy kontrolnej w zależności od obecności RNA wirusa odry.....	44
Tab. XVII. Obecność mRNA <i>IL-1</i> w strzemiączkach chorych na otosklerozę i w strzemiączkach z grupy kontrolnej w zależności od obecności RNA wirusa odry.....	44
Tab. XVIII. Obecność mRNA <i>OPG</i> w strzemiączkach chorych na otosklerozę i w strzemiączkach z grupy kontrolnej w zależności od obecności RNA wirusa odry.....	44
Tab. XIX. Poziom ekspresji badanych genów zależnie od grupy.....	46

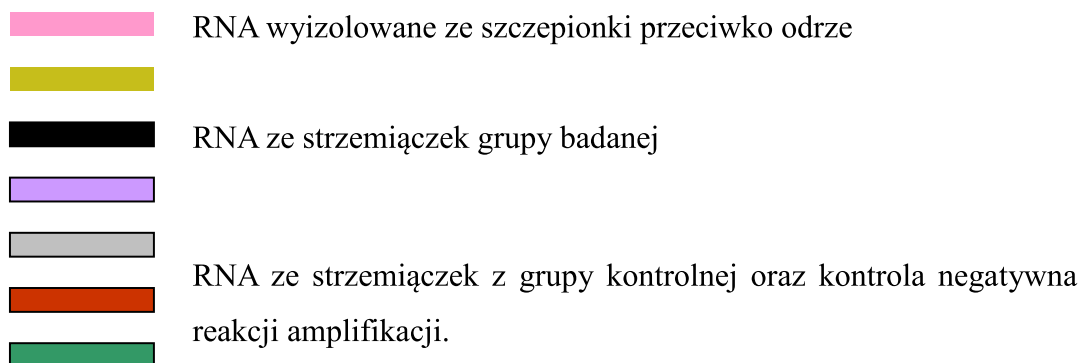
Tab. XX. Współczynniki korelacji $r$ Pearsona w analizie związku między poziomem ekspresji analizowanych genów oraz statystyki opisowe w próbkach odropozytywnych.....	47
Tab. XXI. Związek między czasem trwania choroby a poziomem ekspresji analizowanych genów.....	48
Tab. XXII. Związek między obecnością RNA wirusa odry, poziomem ekspresji genów <i>TNF-<math>\alpha</math></i> i <i>IL-1</i> a poziomem ekspresji genu <i>OPG</i> zbadany za pomocą hierarchicznej analizy regresji.....	50
Tab. XXIII. Rozkład częstości występowania RNA wirusa odry w strzemiączkach zależnie od przebytego zachorowania na odrę.....	51
Tab. XXIV. Rozkład częstości występowania RNA wirusa odry w strzemiączkach niezależnie od przebytego szczepienia przeciwko odrze.....	52

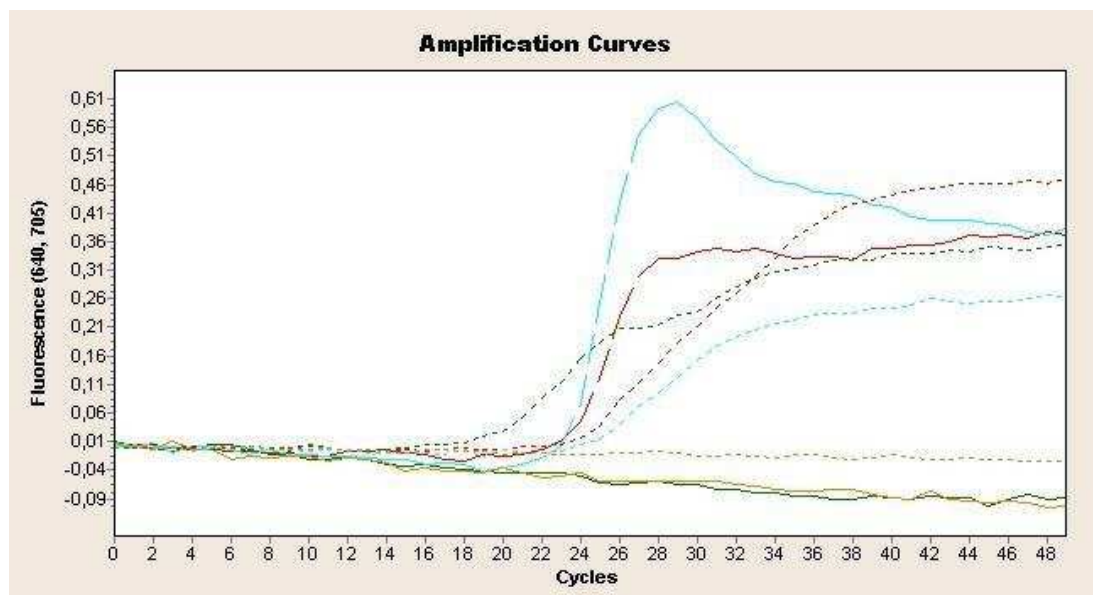


## ANEKS



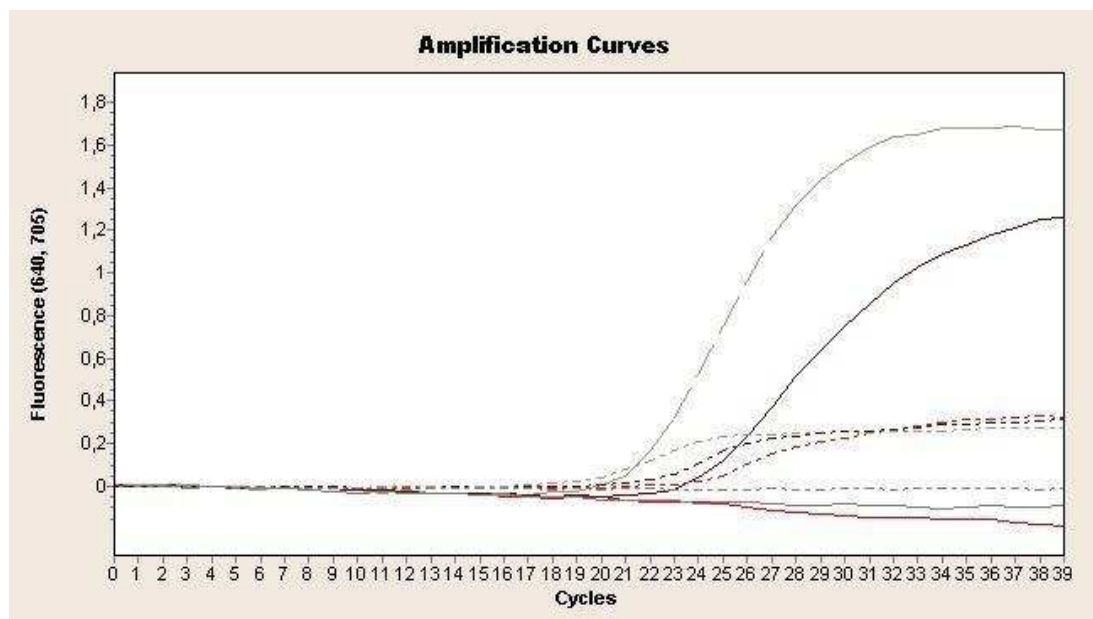
Ryc. 9. Przykładowe wyniki reakcji amplifikacji RNA wirusa odrzy, PCR w czasie rzeczywistym





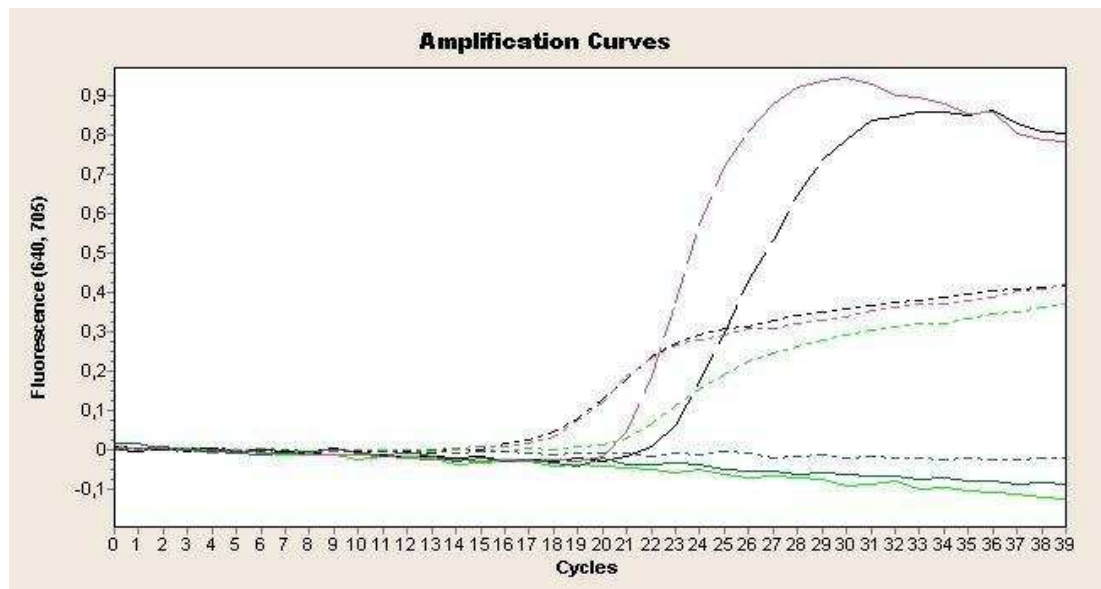
Ryc. 10. Przykładowe wyniki reakcji amplifikacji transkryptu genu *TNFα* wraz z genem referencyjnym, PCR w czasie rzeczywistym

- *TNFα*
- - -  $\beta$  - aktyna
- Kontrola pozytywna reakcji amplifikacji
- Strzemiączko z grupy badanej
- Strzemiączko z grupy kontrolnej
- Kontrola negatywna reakcji amplifikacji



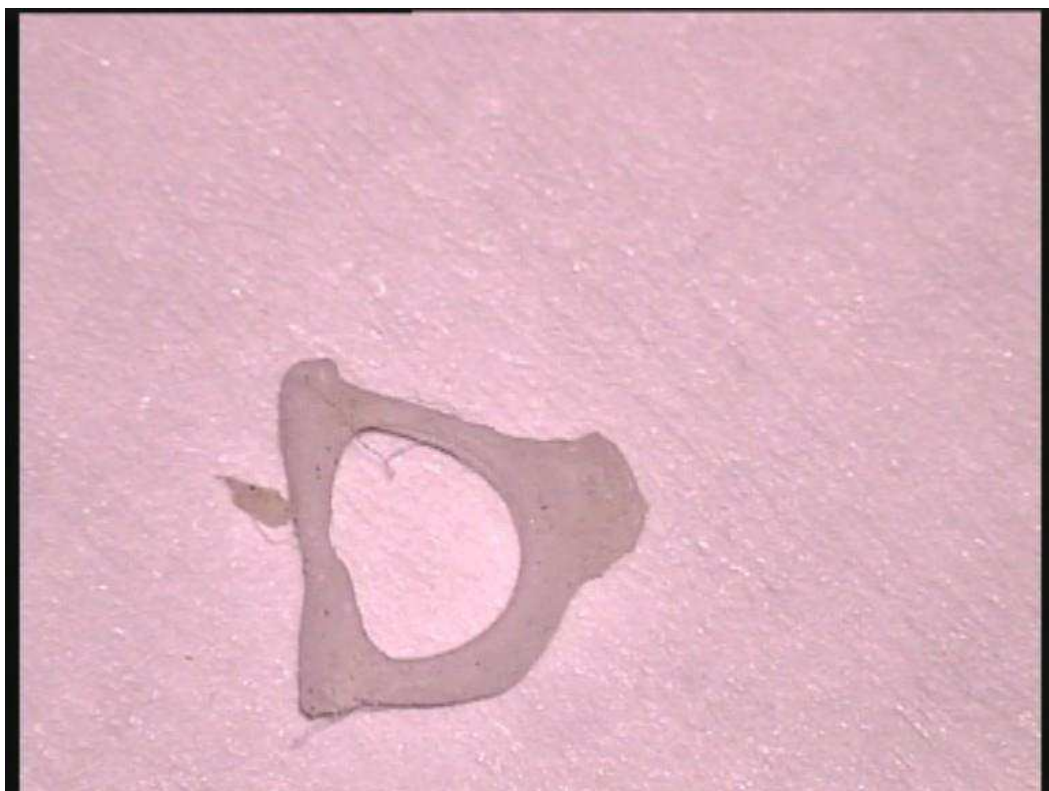
Ryc. 11. Przykładowe wyniki reakcji amplifikacji transkryptu genu *IL-1* wraz z genem referencyjnym, PCR w czasie rzeczywistym

- *IL-1*
- - - *β - aktyna*
- Kontrola pozytywna reakcji amplifikacji
- Strzemiączko z grupy badanej
- Strzemiączko z grupy kontrolnej
- Kontrola negatywna reakcji amplifikacji



Ryc. 12. Przykładowe wyniki reakcji amplifikacji transkryptu genu *OPG* wraz z genem referencyjnym, PCR w czasie rzeczywistym

- *OPG*
- - -  $\beta$  - aktyna
- Kontrola pozytywna reakcji amplifikacji
- Strzemiączko z grupy badanej
- Strzemiączko z grupy kontrolnej
- Kontrola negatywna reakcji amplifikacji



Ryc. 13. Strzemiączko usunięte podczas stapedektomii

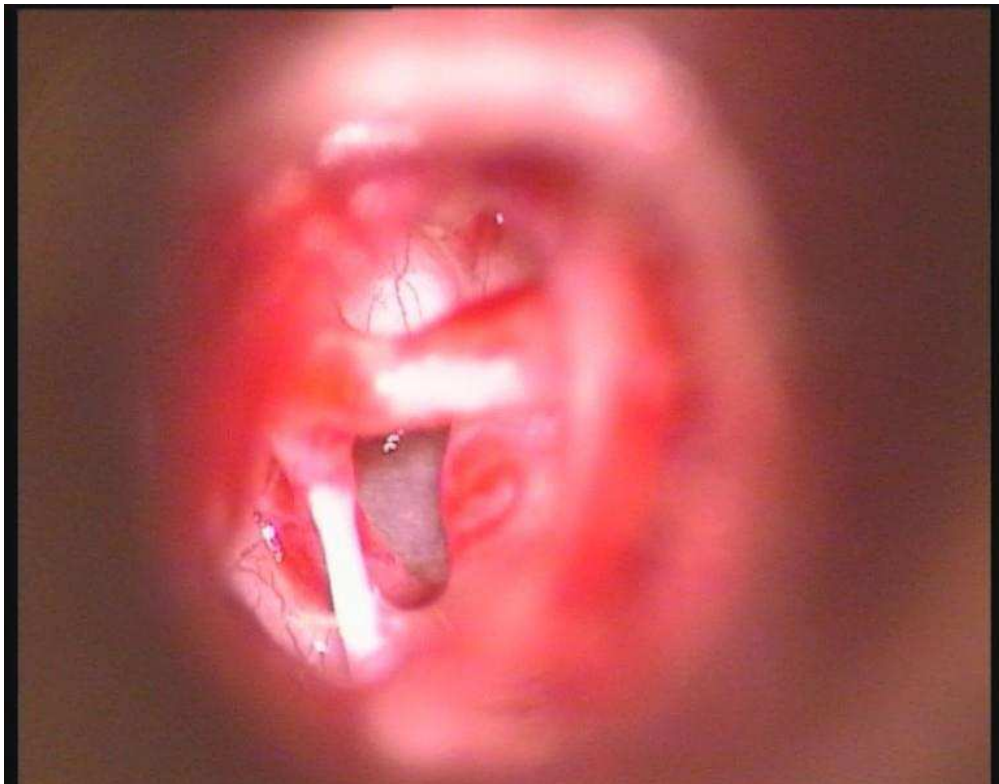


Ryc. 14. Wielkość strzemiączka (moneta 1 - groszowa)





Ryc. 15. Suprastruktura strzemiączka usuniętego podczas stapedotomii  
(moneta 1 - groszowa)



Ryc. 16. Obraz śródoperacyjny ucha środkowego chorej z otosklerozą. Widoczne są:  
odnoga długa kowadełka, nerw twarzowy, mięsień strzemiączkowy, strzemiączko oraz  
płytko strzemiączka (mikroskop operacyjny x16)