

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY**

**DMITRY TRETIAKOW**

**Ocena ekspresji TNF-alfa, IL-1 alfa, IL-6 i IL-10,  
RANKL, MMP-9 oraz stan organizacji włókien kolagenu  
w kieszonce retrakcyjnej błony bębenkowej u chorych  
z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego**

**Gdańsk 2016**

Wydano za zgodą  
Dziekana Wydziału Lekarskiego

**Praca na stopień doktora nauk medycznych finansowana z  
pracy statutowej ST 02-011/07, grantu NN403211839 oraz  
MN nr 01-0237/08/254**

**Promotor: prof. dr hab. med. Jerzy Kuczkowski**

Praca wykonana w Katedrze i Klinice Otolaryngologii GUMed  
kierownik: prof. dr hab. med. Czesław Stankiewicz  
w Zakładzie Medycyny Molekularnej GUMed  
kierownik: prof. dr hab. Tadeusz Pawełczyk  
oraz Zakładzie Mikroskopii Elektronowej GUMed  
kierownik: dr hab. Cecylia Tukaj

Medical University of Gdansk 2016  
ISBN 978-83-65098-36-8

*Promotorowi*  
**Panu Profesorowi dr hab. med. Jerzemu Kuczkowskiemu**  
*za określenie tematyki pracy,*  
*opiekę merytoryczną i nieocenioną pomoc w realizacji pracy,*  
**Panu Profesorowi dr hab. med. Czesławowi Stankiewiczowi**  
*za nieocenioną pomoc w realizacji pracy,*  
*okazaną wyrozumiałość i życzliwość,*  
**Panu Profesorowi dr hab. Tadeuszowi Pawelczykowi**  
*za udostępnienie zaplecza do przeprowadzenia badań i cenne uwagi,*  
**Pani dr hab. Cecylii Tukaj**  
*za udostępnienie zaplecza do przeprowadzenia badań i cenne uwagi,*  
*za nieocenioną pomoc w realizacji pracy*  
**Pani dr hab. med. Monice Sakowicz-Burkiewicz**  
*za życzliwość i ogromną pomoc w realizacji pracy,*  
**oraz mojej żonie Oldze**  
*za cierpliwość*

*SERDECZNIE DZIĘKUJĘ*

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

<b>AT</b>	audiometria tonalna
<b>BB</b>	błona bębenkowa (ang. <i>tympanic membrane</i> )
<b>β-aktyna</b>	beta-aktyna
<b>CD4 (8)</b>	klaster zróżnicowania 4 (8) (ang. <i>cluster of differentiation 4 (8)</i> )
<b>cDNA</b>	komplementarny DNA (ang. <i>complementary DNA</i> )
<b>COM</b>	przewlekłe zapalenie ucha środkowego (ang. <i>chronic otitis media</i> )
<b>CRP</b>	biało C-reaktywne (ang. <i>C-reactive protein</i> )
<b>CSIF</b>	czynnik hamujący syntezę cytokine ( ang. <i>cytokine synthesis inhibitory factor</i> )
<b>CT</b>	tomografia komputerowa (ang. <i>computed tomography</i> )
<b>CT HR</b>	tomografia komputerowa wysokiej rozdzielczości (ang. <i>high resolution computed tomography</i> )
<b>DNA</b>	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>dB</b>	decybel
<b>EGF</b>	czynnik wzrostu nabłonka (ang. <i>epidermal growth factor</i> ).
<b>EP</b>	endogenny czynnik gorączkowy (ang. <i>endogenous pyrogen</i> ),
<b>ETAF</b>	tymocytowy czynnik aktywujący komórki pochodzące z naskórka (ang. <i>epidermal cell-derived thymocyte-activating factor</i> )
<b>FAF</b>	czynnik aktywujący fibroblasty (ang. <i>fibroblast-activating factor</i> ).
<b>FGF</b>	czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>fibroblast growth factor</i> ).
<b>GELB</b>	żelatynaza B (ang. <i>gelatinase B</i> )
<b>GM-CSF</b>	czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (ang. <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> ).
<b>GVHD</b>	choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. <i>graft-versus-host disease</i> ).
<b>H-1</b>	hemopoetyna-1.
<b>HSP</b>	hepatocytowy czynnik stymulujący lub induktor surowicy amyloidu A(ang. <i>serum amyloid A inducer or hepatocyte-stimulating factor</i> )
<b>HL</b>	ubytek słuchu (ang. <i>hearing loss</i> )
<b>IL-1 (3,6,10)</b>	interleukina-1 (3,6,10)
<b>INF-γ</b>	interferon gamma
<b>KR</b>	kieszonka retrakcyjna (ang. <i>retraction pocket</i> )
<b>LAF</b>	czynnik aktywujący limfocyty(ang. <i>lymphocyte-activating factor</i> )
<b>LEM</b>	endogenny mediator limfocytów (ang. <i>leukocyte endogenous mediator</i> )
<b>LPS</b>	lipopolisacharydy
<b>MAPK</b>	kinazy aktywowane mitogenami (ang. <i>mitogen-activated protein kinases</i> )
<b>MMP</b>	metaloproteaza macierzy pozakomórkowej
<b>mRNA</b>	RNA matrycowy, informacyjny(ang. <i>messenger RNA</i> )

<b>NF-kB</b>	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> ) tłumaczenie polskie: czynnik jądrowy aktywujący komórki B
<b>OAF</b>	czynnik aktywujący osteoklasty (ang. <i>osteoclast-activating factor</i> )
<b>OB</b>	odczyn Biernackiego
<b>ODF</b>	czynnik różnicowania osteoklastów (ang. <i>osteoclast differentiation factor</i> )
<b>OME</b>	wysiękowe zapalenie ucha środkowego (ang. <i>otitis media with effusion</i> )
<b>OPGL</b>	ligand osteoprotegeryny (ang. <i>osteoprotegerin ligand</i> )
<b>PCR</b>	łańcuchowa reakcja polimerazowa (ang. <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PGE2</b>	prostaglandyna E2
<b>PIF</b>	czynnik wywołujący proteolizę(ang. <i>proteolysis-inducing factor</i> )
<b>PI3K</b>	kinazafosfatydyloinozytolu,(ang. <i>phosphatidylinositide3-kinases</i> )
<b>PSZ</b>	przewód słuchowy zewnętrzny
<b>PZUŚ</b>	przewlekłe zapalenie ucha środkowego
<b>RANKL</b>	ligand receptora aktywatora czynnika jądrowego NF-kappa B (ang. <i>receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i> )
<b>Real-Time PCR</b>	w czasie rzeczywistym (ang. <i>real-time polymerase chain reaction</i> )
<b>RP</b>	kieszonka retrakcyjna (ang. <i>retraction pocket</i> )
<b>RT-PCR</b>	reakcja łańcuchowa polimerazy poprzedzona odwrotną transkrypcją (ang. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
<b>RNA</b>	kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i> )
<b>TBP</b>	białko referencyjne TBP (ang. <i>TATA-binding protein</i> )
<b>TEM</b>	transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>transmission electron microscopy</i> )
<b>TK</b>	tomografia komputerowa (ang. <i>computed tomography</i> )
<b>TK HR</b>	tomografia komputerowa wysokiej rozdzielczości (ang. <i>high resolution computed tomography</i> )
<b>TM</b>	błona bębenkowa (ang. <i>tympanic membrane</i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	czynnik martwicy guza alfa (ang. <i>tumor necrosis factor alpha</i> )
<b>TNFSF11</b>	ligand czynnika martwicy nowotworu nadrodziny receptora 11 (ang. <i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 11</i> )
<b>TRAFs</b>	czynnik (białko adaptorowe) związany z receptorem TNF (ang. <i>TNF receptor associated factors</i> )
<b>TRANCE</b>	TNF-podobna cytokina indukująco-aktywująca (ang. <i>TNF-related</i> )

## SPIS TREŚCI

<b>1. Wstęp</b>	<b>9</b>
1.1. Wprowadzenie	9
1.2. Anatomia i fizjologia błony bębenkowej	9
1.3. Przewlekłe zapalenie ucha środkowego. Definicja atelektazji i kieszonki retrakcyjnej	14
1.4. Epidemiologia przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną	16
1.5. Etiologia i patogenezą powstania kieszonki retrakcyjnej	17
1.6. Klasyfikacja kieszzonek retrakcyjnych	21
1.7. Objawy, diagnostyka i metody leczenia przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną	27
1.8. Omówienie badanych cytokin	30
<b>2. Cel pracy</b>	<b>40</b>
<b>3. Materiały i metody</b>	<b>41</b>
3.1. Kryteria wyłączenia z badania	41
3.2. Materiał badań	42
3.3. Metody badań	42
3.3.1. Badanie otolaryngologiczne	42
3.3.2. Metody badań radiologicznych	43
3.3.3. Metody badań audiologicznych	43
3.3.4. Materiał i metody badań molekularnych	45
3.3.4.1. Odczynniki zastosowane w badaniach molekularnych	45
3.3.4.2. Metody badań molekularnych	47
3.3.5. Transmisyjna mikroskopia elektronowa	49
3.3.6. Metody analizy statystycznej	50
<b>4. Wyniki</b>	<b>51</b>
4.1. Analiza cech epidemiologiczno-klinicznych chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną	51
4.2. Analiza danych otologicznych	53
4.3. Stopień zaawansowania kieszonki retrakcyjnej	53
4.4. Analiza wyników badań audiologicznych	53
4.5. Analiza wyników badań molekularnych	55
4.5.1. Ocena poziomu ekspresji genu dla IL1 $\alpha$ u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną	56
4.5.2. Ocena poziomu ekspresji genu dla IL-6 u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną	57

4.5.3. Ocena poziomu ekspresji genu dla IL-10 u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną	59
4.5.4. Ocena poziomu ekspresji genu dla TNF- $\alpha$ u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną	61
4.5.5. Ocena poziomu ekspresji genu dla MMP-9 u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną	63
4.5.6. Ocena poziomu ekspresji genu dla RANKL u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną	65
4.5.7. Korelacja między oznaczonym poziomem mRNA a poziomem białka w analizie ekspresji badanych genów	67
4.5.8. Zależność między poziomem ekspresji badanych genów a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną	70
4.5.8.1. Korelacja między poziomem ekspresji genu IL-1 $\alpha$ a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną	70
4.5.8.2. Korelacja między poziomem ekspresji genu IL-6 a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną	73
4.5.8.3. Korelacja między poziomem ekspresji genu IL-10 a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną	76
4.5.8.4. Korelacja między poziomem ekspresji genu TNF- $\alpha$ a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną	79
4.5.8.5. Korelacja między poziomem ekspresji genu MMP-9 a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną	82
4.5.8.6. Zależność między poziomem ekspresji genu TNFSF11 a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną	84
4.6. Wyniki badań w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM)	87
<b>5. Omówienie wyników</b>	<b>100</b>
<b>6. Wnioski</b>	<b>113</b>
<b>7. Piśmiennictwo</b>	<b>114</b>
<b>8. Streszczenie</b>	<b>125</b>
<b>9. Summary</b>	<b>127</b>





## 1. WSTĘP

### 1.1. Wprowadzenie

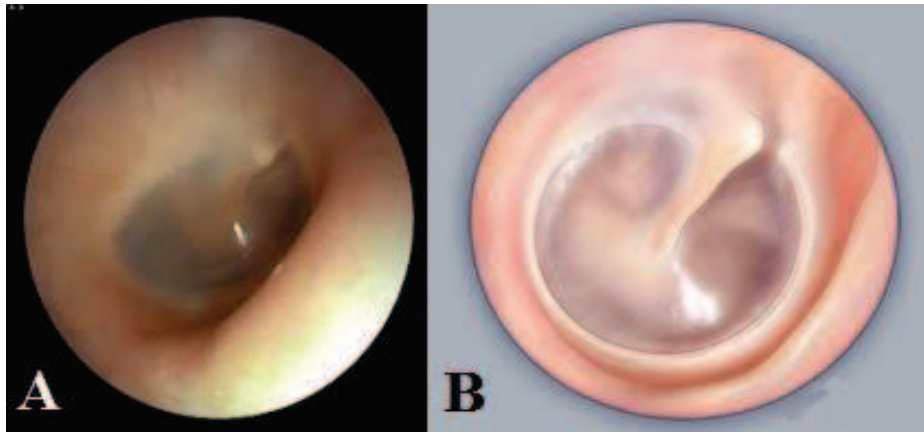
Jak przedstawia biuletyn WHO z 2010 roku około 360 mln ludzi na całej Ziemi mają problemy ze słuchem. Połowie wszystkich przypadków głuchoty i niedosłuchu można zapobiec poprzez profilaktykę, wczesne wykrycie i leczenie [arkusz nr 300 WHO, luty 2014]. Podstawowym zadaniem lekarzy jest wczesna diagnostyka niedosłuchu, identyfikacja i wyeliminowanie przyczyny utraty słuchu oraz podjęcie czynności ukierunkowanych na rehabilitację słuchu. Jedną z głównych przyczyn niedosłuchu jest przewlekłe zapalenie ucha środkowego. Jednakże wiele problemów dotyczących diagnostyki i leczenia przewlekłego zapalenia ucha środkowego pozostaje nierozwiązanych. Do tej pory nie wypracowano wszystkich kryteriów diagnostycznych obiektywnej oceny stanu ucha środkowego. Przyczyny powstania kieszonki retrakcyjnej (KR) oraz mechanizm niszczenia kości w tej chorobie są niejasne. Wiele hipotez na ten temat nie przyczyniły się do wyboru najlepszej metody leczenia przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną. Powstanie i rozwój KR stanowi zatem ważny problem dla otolaryngologów, gdyż upośledza słuch oraz może stanowić pole dla rozwoju perlaka. Zdaniem niektórych badaczy, ocena KR, jako jednej grupy z podobnym pochodzeniem chorobotwórczym jest niewłaściwe.

Wykazano, że kieszonka retrakcyjna (atelektazja) stanowi ważny etap w rozwoju ciężkiej patologii ucha środkowego jakim jest perlak. Pojęcie stanu przed perlakowego na określenie stanu zagrażającego rozwojem perlaka wprowadził Bremond G. w 1976 roku [23]. Jest to sytuacja, gdy część warstwy naskórka błony bębenkowej przestaje być prawidłowo wentylowana od strony przewodu słuchowego zewnętrznego (PSZ). Klinicznie jest to przewlekłe zapalenie ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną z wyciekami, gromadzącym się naskórkiem, czasami z rozrostem ziarniny lub polipem.

### 1.2. Anatomia i fizjologia błony bębenkowej

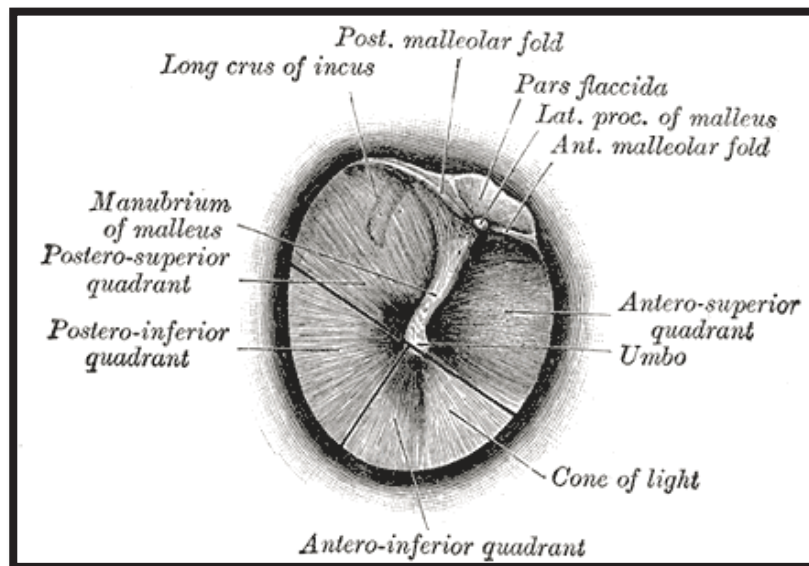
Błona bębenkowa (BB) jest przegrodą tkankową, barwy szaro-perlistej, która jest granicą między przewodem słuchowym zewnętrznym a uchem środkowym. Umocowana jest do pierścienia chrzęstno-włóknistego, w rowku przewodu słuchowego zewnętrznego (PSZ) kości bębenkowej (ryc. 1, 2). Błona bębenkowa ma kształt elipsy z niewielkim stożkiem zwróconym w kierunku wzniesienia, pochylona do przodu i ku tyłowi. Wymiary jej wynoszą 8,5-10 mm x 8-9 mm, powierzchnia - około 85-100 mm<sup>2</sup>. U noworodka, który nie ma ukształtowanej części kostnej PSZ, jest położona prawie poziomo w stosunku do PSZ [10, 18].

U dorosłych kąt jej nachylenia do płaszczyzny poziomej wynosi 40-60° i jest otwarty ku przodowi (kąt inklinacji), z płaszczyzną pionową tworzy kąt 50° otwarty do tyłu (kąt deklinacji) [24].



**Rycina 1.** Niezmieniona błona bębenkowa ucha prawego: A. Zdjęcie wykonane w endoskopie B. Schemat obrazu endoskopowego

**Figure 1.** Normal eardrum of the right ear: A. Endoscopy image. B. Scheme of the endoscopic image



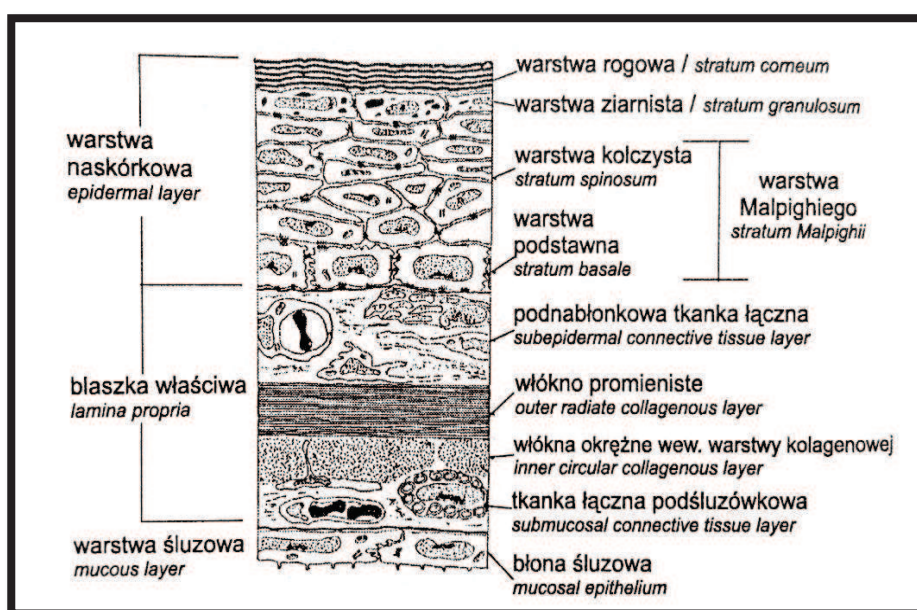
**Rycina 2.** Schemat błony bębenkowej. Widok od strony przewodu słuchowego zewnętrznego [58]

**Figure 2.** Scheme of the tympanic membrane. View from the external auditory meatus [58]

Nieprawidłowe nachylenie błony bębenkowej spotykane jest często u osób z zaburzeniami rozwoju ucha środkowego a także osób głuchych od urodzenia. W przypadkach wrodzonej atrezji PSZ stwierdza się brak błony bębenkowej z towarzyszącym temu zupełnym lub częściowym brakiem kosteczek słuchowych [17, 114].

Błona bębenkowa składa się z dwóch części:

- części napiętej (większa część błony bębenkowej) - umocowana w kości bębenkowej pierścieniem włóknisto-chrzęstnym. Grubość części napiętej waha się od 0,03 do 0,12 mm (ryc. 3) [86, 144].



**Rycina 3.** Schemat budowy części napiętej błony bębenkowej [84]

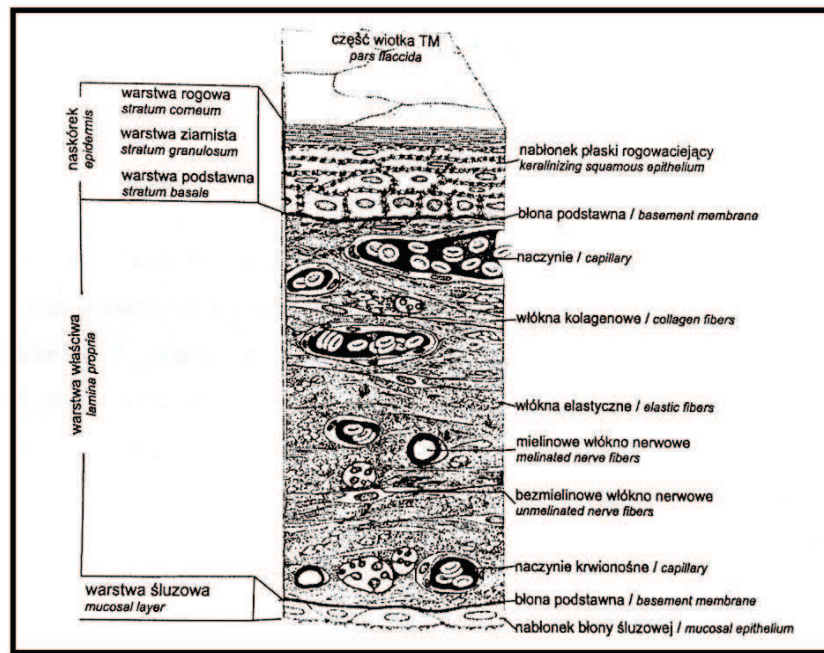
**Figure 3.** Scheme of parts tense of the tympanic membrane [84]

- część wiotka, błona *Schrapnella* - mniejsza, górna część błony bębenkowej, pozbawiona warstwy włóknistej. Przyczepia się ona bezpośrednio do okostnej łuski kości skroniowej w jej wcięciu bębenkowym (wcięciu Riviniego). Grubość części wiotkiej wynosi 0,03-0,23 mm (ryc. 4) [86].

Błona bębenkowa zbudowana jest z trzech warstw:

- warstwa zewnętrzna – naskórkowa.
- warstwa środkowa – blaszka właściwa.
- warstwa wewnętrzna – śluzowa.

Warstwę zewnętrzną stanowi nabłonek płaski rogowaciejący skóry przewodu słuchowego zewnętrznego. Najgrubsza jest w części wiotkiej i na prążku młoteczka (50-60  $\mu\text{m}$ ). Proces migracji jest jednym z bardziej interesujących zjawisk występujących na błonie bębenkowej. Pierwsze obserwacje tego procesu pochodzą z końca XIX wieku (cyt. wg [88]). W uszach zdrowych dominuje migracja naskórka w kierunku tylnogórnym. Prędkość migracji wynosi około 131  $\mu\text{m}$  na dobę, który najszybciej przebiega w okolicy pępka BB oraz rękojeści młoteczka. Z wiekiem ten proces ulega spowolnieniu [3, 88].



**Rycina 4.** Schemat budowy części wiotkiej błony bębenkowej [85]  
**Figure 4.** Scheme of parts flaccid of the tympanic membrane [85]

Część środkowa (włóknista) błony bębenkowej, czyli blaszka właściwa, występuje tylko w części napiętej. Składa się ona z dwóch warstw włókien biegnących promieniście – od zewnątrz, i biegnących okrężnie – od wewnątrz. Warstwa włókien promienistych łączy się luźno z warstwą naskórkową, przy czym jej włókna przechodzą w delikatne wiązki włókienek skóry właściwej. Włókna warstwy promienistej najgęściej skupiają się w okolicy pępka oraz w dolnej połowie prążka rękojeści młoteczka. W odróżnieniu od warstwy promienistej, włókna warstwy okrężnej najgęściej skupiają się na obwodzie BB, ku środkowi - stają się coraz rzadsze, aż zupełnie zanikają. Blaszka właściwa tworzy na obwodzie pierścień włóknisto-chrzęstny, który składa się ze zbitej tkanki łącznej z włóknami sprężystymi oraz pojedynczo rozrzuconymi komórkami chrzęstnymi. Mały trójkątny fragment BB, położony pod błoną Schrapnella, trójkąt międzypromienisty, nie posiada warstwy

włóknistej [17]. Warstwę wewnętrzną błony bębenkowej stanowi błona śluzowa jamy bębenkowej (grubość 20-40  $\mu\text{m}$ ). Tworzą ją pojedyncze komórki nabłonka sześciennego, leżącego na włóknistej blaszce właściwej, zawierającej naczynia.

W części wiotkiej BB warstwa śluzowa jest grubsza niż w części napiętej i zawiera około 10 warstw komórek płaskich. Pomiędzy komórkami nabłonka płaskiego występują pojedyncze komórki, które zawierają charakterystyczne ziarnistości (Birbecka) - komórki Langerhansa. Rola tych komórek polega na rozpoznaniu antygeny i jego prezentacji limfocytom. Dystrybucja komórek immunologicznie kompetentnych w części wiotkiej BB jest podobna jak w regionie pierścieniowym części napiętej. Część napięta błony bębenkowej, za wyjątkiem okolicy pierściennej i rękkojeści młoteczka, posiada niedobór komórek immunologicznie kompetentnych. W warstwie właściwej BB w okolicy pierściennej i rękkojeści młoteczka występują limfocyty, makrofagi, mastocyty oraz pojedyncze komórki Langerhansa [64].

Błona podstawna części wiotkiej błony bębenkowej składa się z komórek podstawnych z hemidesmosomami, blaszki przezroczystej z mikrofilamentami, blaszki ciemnej oraz obszaru fibrylarnego, zbudowanego z kolagenu typu IV. Jej grubość wynosi od 0,5 do 2  $\mu\text{m}$  [87]. Pomiędzy nabłonkiem a błoną śluzową części wiotkiej BB znajduje się gruba warstwa luźnej tkanki łącznej, zawierająca fibroblasty, limfocyty, mastocyty, fagocyty, nerwy, ciała Pacciniego, naczynia oraz luźno leżące elastyczne włókna kolagenowe (ryc. 4) [29, 87].

Nabłonek części napiętej błony bębenkowej składa się z:

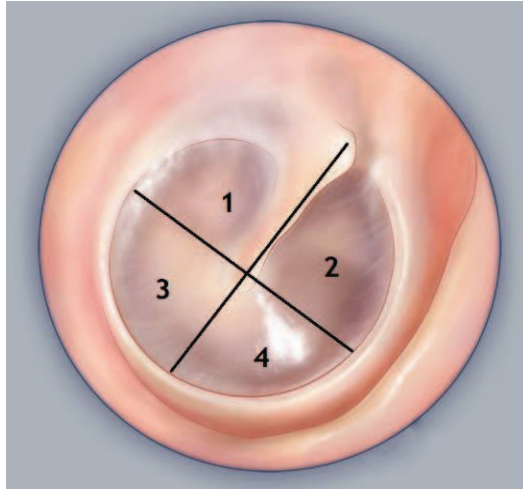
- a) jednej warstwy komórek podstawnych,
- b) warstwy kolczystej, składającej się z 4-5 warstw komórek płaskich,
- c) warstwy ziarnistej, zbudowanej z płaskich komórek zawierających ziarna keratyny, mikrofilamenty i liczne desmosomy oraz
- d) warstwy rogowej. W części napiętej BB, pomiędzy warstwami luźnej tkanki łącznej, znajduje się blaszka właściwa [17, 86].

Bezpośrednio za częścią napiętą położona jest rękkojeść młoteczka i wyrostek boczny młoteczka. Zrastają się one z błoną bębenkową, wytwarzając na niej wyniosłość młoteczka i biegnący ku dołowi i tyłowi prążek młoteczka. Zakończony jest on centralnie położonym zagłębieniem w błonie bębenkowej zwanym pępkiem. Na wysokości wyniosłości młoteczkowej, poziomo ku przodowi i tyłowi przebiegają dwa fałdy błony bębenkowej, które ograniczają od dołu błonę Schrapnella:

- fałd młoteczkowy przedni, zawierający więzadło przednie młoteczka (fałd von Troeltsch'a),
- fałd młoteczkowy tylny, zawierający tylny odcinek struny bębenkowej.

Dla celów dydaktycznych i klinicznych błonę bębenkową podzielono na cztery kwadranty (ryc. 2, 5). Tworzą je dwie linie przechodzące przez pępek błony i przecinające się pod kątem  $90^\circ$  (pierwsza z nich poprowadzona jest prostopadłe do rękkojeści, druga - w osi rękkojeści) (ryc. 5):

1. kwadrant tylny-górny (27  $\text{mm}^2$ ).
2. kwadrant przednio-górny (22  $\text{mm}^2$ ).
3. kwadrant tylny-dolny (14,5  $\text{mm}^2$ ).
4. kwadrant przednio-dolny (6  $\text{mm}^2$ ).



**Rycina 5.** Podział błony bębenkowej na kwadranty. Ucho prawe  
**Figure 5.** Scheme of the eardrum: anatomical division the eardrum to the quadrants. Right ear

Wytrzymałość błony bębenkowej jest duża (nie ulega uszkodzeniu pod ciśnieniem do 13,33 kPa), natomiast jej sprężystość jest mała [17, 87]. Fale dźwiękowe, dochodzące do błony bębenkowej, częściowo się odbijają od niej. Pozostała część tych fal wprowadza błonę bębenkową w drgania, które są następnie przenoszone na łańcuszek kosteczek słuchowych (młoteczek, kowadełko i strzemiączko). Ostatecznie fale dźwiękowe trafiają do przychłonki przez okienko owalne (okienko przed-sionka), w którym usytuowana jest płytka strzemiączka. Oprócz przewodnictwa drogą kosteczek słuchowych, fale dźwiękowe docierają do ucha wewnętrznego za pośrednictwem przewodnictwa powietrznego - przez jamę bębenkową bezpośrednio na okienko owalne.

Oprócz funkcji transmisyjnej, BB pełni funkcje ochronną oraz oczyszczającą ze złuszczonego naskórka [4].

### 1.3. Definicja przewlekłego zapalenia ucha środkowego z atelektazją (kieszonką retrakcyjną). Rys historyczny badań nad kieszonką retrakcyjną i atelektazją

Uszkodzenie błony bębenkowej odgrywa istotną rolę w przewlekłego zapalenia ucha środkowego. Określenie "przewlekłe zapalenie ucha środkowego" (PZUŚ) obejmuje: przewlekłe proste, ropne, perlakowe lub ziarninowe, zapalenie ziarninowe, zapalenie zarostowe ucha środkowego, zapalenie z atelektazją/ kieszonką retrakcyjną błony bębenkowej i z tympanosklerozą.

Uważa się, że atelektazja jest nieaktywną postacią przez PZUŚ. Polega na częściowej lub całkowitej deformacji oraz niszczeniu błony bębenkowej, w której war-

stwa naskórkowa jest workiem przepukliny do jamy bębenkowej, a jej wrotami jest otwór w warstwie włóknistej [22]. Proces chorobowy kieszonki retrakcyjnej polega na wciągnięciu ścięzcałej (niepełnowartościowej) błony bębenkowej do jamy bębenkowej z „oklejeniem” kosteczek słuchowych, mięśni, zatok i wzdórka (ryc. 6). Jeżeli atelektazja dotyczy tylko części błony bębenkowej, mówimy wówczas o kieszonce retrakcyjnej.

Mówiąc o KR otolodzy posługują się następującą terminologią:

- Atelektazja błony bębenkowej – wpuklenie w stronę jamy bębenkowej całej BB.
- Kieszonka retrakcyjna części napiętej BB – wgłobienie/retrakcja do jamy bębenkowej tylko w jej części napiętej.
- Kieszonka retrakcyjna części wiotkiej BB – retrakcja do jamy bębenkowej tylko jej części wiotkiej.
- Kieszonka retrakcyjna z perlakiem – duża kieszonka z cechami stanu zapalnego, nieodprowadzalna (zrośnięta ze wzdórkiem lub kosteczkami słuchowymi), wypełnione jej wnętrze masami naskórka lub perlaka, których nie można usunąć w całości.

Pierwszy o kieszonce retrakcyjnej pisał w 1890 roku niemiecki otolog Friedrich Bezold, przedstawiając teorię retrakcyjną powstania perlaka [139].

Później nazwa kieszonki retrakcyjnej związana była z zagadnieniem następstw tympanoplastyki typu zamkniętego, doprowadzającej do powstania perlaka w uchu środkowym [51]. Tworzyły się one przez wpuklenie BB w jej tylnej części blisko pierścienia włóknistego i wypełniały mezotympanum i nadbębenek (epitympanum) [8]. Rozwój perlaka z wtórnych kieszonek retrakcyjnych był podobny jak w przewlekłym zapaleniu ucha środkowego [45].

Dalsze obserwacje kliniczne wykazały obecność kieszonek w błonie bębenkowej nieoperowanych uszu; może ona doprowadzić do powstania perlaka, co zostało potwierdzone w badaniach eksperymentalnych [154]. Deguine udokumentował tworzenie się perlaka w KR, wykonując zdjęcia błon bębenkowych w ciągu kilkunastu lat podczas badań okresowych pacjentów z PZUŚ, czym potwierdził ewolucję kieszonek retrakcyjnych [46].



**Rycina 6.** Widok błony bębenkowej z atelektazją w badaniu endoskopowym.  
Ucho lewe

**Figure 6.** The endoscopic view of the atelectasis tympanic membrane. Left ear

#### **1.4. Epidemiologia przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną**

Tos i wsp. zauważyli podczas badania dzieci z wysiękowym zapaleniem uszu, że w 34% występują różnego stopnia ogniskowe atelektazje (kieszonki retrakcyjne) [140].

Chen i wsp. w badaniach epidemiologicznych stwierdzili KR u 5,24% dzieci przedszkolnych z wysiękowym zapaleniem ucha [34].

Według danych wielu autorów KR najczęściej lokalizują się w części wiotkiej [152, 155]. Maw i wsp. w wyniku obserwacji dzieci z nawracającym wysiękowym zapaleniem ucha środkowego (przez okres 12 lat), ustalili występowanie KR w części wiotkiej błony bębenkowej w 40% przypadkach, w części napiętej – w 17% przypadków [96].

Według Arsa, w 40% przypadków KR występują w części wiotkiej BB, w 36% w jej kwadrancie tylnogórnym i w 26% w innych miejscach błony bębenkowej [8].

Ciekawe dane opublikowali Stangerup i wsp., którzy stwierdzili obecność KR w uszach zdrowych dzieci, w 14-26% przypadków w części wiotkiej i w 0,3-3,7% - w części napiętej błony bębenkowej [133].

Nierzadko w KR rozwija się perlak. Sade obserwując w ciągu 3 lat pacjentów z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z KR, których nie leczono wcześniej chirurgicznie, zaobserwował w 2% przypadków rozwój perlaka [121]. Według innych badaczy, perlak rozwija się w 4% przypadków [74, 140].

Wykazano zależność nawrotów KR po leczeniu operacyjnym u nałogowych palaczy. U pacjentów stosujących dopalacze przez nos nawrót KR następował u 34% badanych w porównaniu z grupą kontrolną (7%) [136].



### 1.5. Etiologia powstania kieszonek retrakcyjnych

Patogeneza powstania KR jest nadal niejasna. Jest jednak faktem, że ostre i przewlekłe zapalne ucha środkowego oraz wysiękowe zapalenie ucha środkowego predysponują do powstania i rozwoju kieszonek retrakcyjnych [69, 123, 155].

Powstanie KR wiąże się z zaburzeniem wentylacji ucha środkowego [8, 22]. Zależy to od równowagi dostarczanego i oddawanego powietrza przez trąbkę słuchową i naczynia błony śluzowej jamy bębnekowej [22], jakkolwiek testy czynnościowe (czynne i bierne) trąbki słuchowej nie korelują z obrazem klinicznym PZUŚ z kieszonką retrakcyjną [53].

Opierając się na badaniach połączeń neuronalnych ucha środkowego i mięśni trąbki słuchowych u makaków, Eden i wsp. przedstawili hipotezę o neuronalnej regulacji wentylacji jamy bębnekowej podobnej do regulacji pęcherzykowej w dolnych drogach oddechowych [47].

Paparella był twórcą teorii „ciągłości” w patogenezie przewlekłych zapaleń uszu. Wysiękowe zapalenie ucha środkowego może ulec wyleczeniu albo przekształcić się w zapalenie przewlekłe bądź utajone oraz doprowadzać do powstania KR lub perlaka [108].

Niezależnie od etiologii, KR zachowuje się bardzo dynamicznie. W niektórych przypadkach może przez dłuższy czas pozostawać stabilną, bez powstania widocznych zmian. W innych może prowadzić do powstania perforacji błony bębnekowej w kieszonce retrakcyjnej, co obserwuje się w 40% KR części napiętej. W innych przypadkach następuje proces rozwoju KR (w 15-20% przypadków) z pogłębieniem KR i penetracją do nadbębienka, destrukcją części ściany bocznej nadbębienka i kosteczek słuchowych [120, 123].

Ars uważa, że jest to choroba, której przebieg zależy od umiejscowienia oraz dynamiki rozwoju [8]. Bremond i wsp. traktują kieszonkę jako uniwersalną zmianę morfologiczną błony bębnekowej, spotykaną w różnych chorobach uszu [22]. Akyildiz i wsp. badając KR, uwzględniają jej etiologię i obraz kliniczny, definiując ją jako lokalne wpuklenie błony bębnekowej, rozwijające się w wyniku zaburzenia czynności trąbki słuchowej [1].

Ścieńczenie włókien kolagenowych w blaszce właściwej błony bębnekowej jest zwiastunem powstania kieszonki retrakcyjnej. Przyczyna osteolizy kosteczek słuchowych, obramowania kostnego błony bębnekowej w KR nadal nie jest wyjaśniona mimo wielu hipotez na ten temat [5, 8, 127].

Badania anatomiczne części wiotkiej BB wykazały, że posiada ona najłabsze właściwości mechaniczne [8]. W kwadrancie tylnego-górnego BB włókna okrężne są cieńsze i rzadsze, co powoduje, iż błona bębnekowa w tych miejscach jest mniej odporna na zmianę ciśnienia. Obserwacje kliniczne potwierdzają, że właśnie w tych kwadrantach KR powstają najczęściej. Czynnikiem warunkującym takie umiejscowienie KR mogą być również stany zapalne ucha środkowego, wywołujące najbardziej nasiloną reakcję zapalną w obrębie części wiotkiej oraz w kwadrancie tylnego-górnym BB. Usytuowane tam granulocyty wydzielają ponad 20 enzymów, z których elastazy i kolagenazy niszczą włókna elastyczne i kolagenowe BB [118]. Badania

histologiczne KR wykazały, że blaszka właściwa ulega zanikowi, jest cieńsza i zawiera mniej włókien elastycznych [8, 22].

Mechanizmy powodujące powstanie KR i jej rozwój można podzielić na zewnętrzzbębenkowe i wewnętrzzbębenkowe [22]. Enzymy proteolityczne, odpowiedzialne za mechanizmy wewnętrzzbębenkowe, znajdują się w wysięku zapalnym i w obrzękniętej błonie śluzowej ucha środkowego. Nie wszystkie jednak stany zapalne w uchu środkowym doprowadzają do powstania KR, ponieważ jednocześnie istnieją enzymy o działaniu przeciwnym, co zapewnia stan równowagi. Destrukcja przebiegająca w obrębie blaszki właściwej i warstwy naskórkowej może doprowadzić do powstania perforacji błony bębenkowej. Mechanizm zewnętrzzbębenkowy uwarunkowany jest proteolitycznym działaniem naskórka, który uległ stanowi zapalnemu. Kolagenazy naskórka (lizozymy i hydrolazy) mogą być przyczyną zniszczenia nie tylko włókien kolagenowych BB, ale również powodować destrukcję sąsiadującej tkanki kostnej i kosteczek słuchowych. Szczególnie dotyczy to zaawansowanego stadium KR, w którym dochodzi do gromadzenia się naskórka w kieszonce i powstania lokalnego stanu zapalnego [69]. Tworząca się przepuklina z warstwy naskórkowej doprowadza do zwiększenia obszaru, objętego stanem zapalnym. Badanie Sade wykazały, że w 80% przypadków KR z infekcją obserwuje się cechy destrukcji kości ścian przewodu słuchowego zewnętrznego lub kosteczek słuchowych [121]. Badania histologiczne wykazują, iż naskórek KR zawiera dużą ilość komórek Langerhansa, których rola w patogenezie KR nie jest w pełni wyjaśniona. Innego zdania jest Gantz, który uważa, że to makrofagi skóry aktywowane przez proces zapalny powodują destrukcję kości [55].

Gromadzenie naskórka w KR świadczy o zaawansowaniu procesu patologicznego z możliwością powstania perlaka. Obserwacje kliniczne potwierdzają ewolucyjny charakter kieszonek retrakcyjnych [46]. Współistniejące z KR wysiękowe zapalenie ucha środkowego jest czynnikiem predysponującym do powstania kieszonki retrakcyjnej.

Przemiana KR w perlaka może odbywać się w jednym z trzech mechanizmów: 1) przez migrację naskórka poprzez perforację BB, przez wywołanie stanu zapalnego 2) przez metaplastię nabłonka lub 3) poprzez migrację komórek naskórka przez nabłonek [31, 40, 155].

Zdaniem niektórych badaczy, ocena całościowa kieszonek retrakcyjnych, jako jednej grupy z podobnym pochodzeniem chorobotwórczym jest niewłaściwe. Otology wciąż patrzą na przewlekłe zapalenie ucha środkowego z KR jako chorobę o nieznanym etiologii, a przyczyna osteolizy w kieszonkach retrakcyjnych nadal kontrowersyjną jest niejasna, pomimo dużej ilości hipotez na ten temat [32, 73, 123]. Istnieje wiele czynników i mechanizmów powodujących powstanie kieszonki retrakcyjnej. Zmiany patologiczne w błonie bębenkowej w procesie powstania KR można określić jako:

- stany zapalne w obrębie jamy bębenkowej i wyrostka sutkowatego,
- obstrukcję przejściową trąbki słuchowej spowodowaną stanem zapalnym,
- powstanie ciśnienia ujemnego w uchu środkowym przez wymianę gazów w procesie dyfuzji tkankowej,
- osłabienie/ ścięcenie warstwy włóknistej KR

- pod wpływem działania endotoksyn drobnoustrojowych,
- wciągnięcie/ retrakcja błony bębnekowej przyśrodkowe,
- proliferacja i migracja komórek blaszki właściwej i hiperkeratoza,
- powstanie perlaka.

Przyczyna powstania osteolizy w kieszonkach retrakcyjnych jest nadal niejasna. Kaskada procesu niszczenia kości składa się z wielu etapów, skierowanych na niszczenie komponenty mineralnej i organicznej tkanki kostnej przez osteoklasty. Osteoklasty w tym procesie są rodzajem makrofagów, które wywodzą się ze szpiku kostnego. Główną ich funkcją jest niszczenie kości [35, 99]. Są to duże (średnica do 100  $\mu\text{m}$ ), owalne komórki, mające wiele jąder (polikariocyty). Powstają z jednojądrowych prekursorów, osteoblastów. Te ostatnie, podobnie jak osteoklasty, mają na swojej powierzchni glikoproteinę RANK, która może się wiązać z glikoproteiną RANKL powierzchni osteoblastów. Takie wiązanie pobudza syntezę czynnika transkrypcji c-Fos, który wzbudza transkrypcję kilku genów niezbędnych do różnicowania i aktywacji osteoklastów [93, 103]. Prekursory osteoklastów mogą również same regulować swoje różnicowanie. Niekiedy c-Fos może aktywować gen dla interferonu  $\beta$ , który hamuje proces różnicowania prekursorów osteoklastów i proces niszczenia kości.

Pierwszy etap osteolizy polega na wytworzeniu prekursorów osteoklastów w tkance kostnej. Osteoklasty powstają przez fuzję 5–10 komórek prekursorowych. Witamina  $D_3$  pobudza ten proces. Osteoklast jest komórką wielojądrową (polikariocyt). Ma zazwyczaj 5–10 jąder i kwasochłonną cytoplazmę. Osteoklasty znajdują się najczęściej na powierzchni kości, leżąc w charakterystycznych zatokach (*lacuna Howshipi*), chociaż niekiedy leżą nad osteoblastami lub osteoklastami [90, 99].

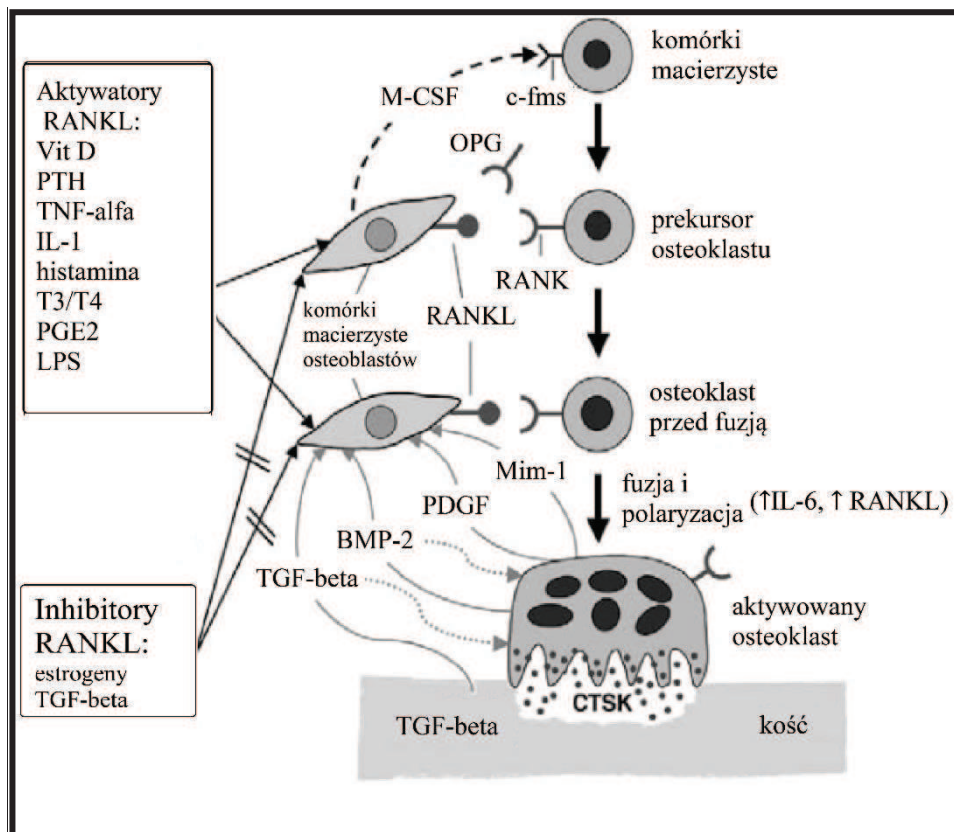
Następnym etapem osteolizy jest destrukcja i niszczenie niezmineralizowanej warstwy osteoidu na powierzchni kości przez enzymy proteolityczne (MMP, kolagenazy, gelatinyzy), wytwarzane przez osteoklasty [79, 98]. W miejscu resorpcji kostnej osteoklasty wiążą się z macierzą kostną za pomocą integryn  $\alpha\beta_3$ . Po związaniu się komórek z macierzą kości, dochodzi do ich polaryzacji, w wyniku której tworzą się trzy specyficzne struktury: błona bazolateralna, rąbek szczoteczkowy i zatoka resorpcyjna. Zatoka resorpcyjna będąca docelowym miejscem przebiegu procesu resorpcji kości, znajduje się między kością a rąbkiem brzeżnym, a jej pH utrzymuje się na poziomie 3–4. Zachowanie tak niskiego pH możliwe jest dzięki działaniu jednego z enzymów syntetyzowanych przez osteoklasty - anhidrazy węglanowej II. Całość reakcji zachodzących w zatoce prowadzi do jej zakwaszenia i rozpuszczenia składników mineralnych macierzy. Składniki organiczne są niszczone przy pomocy MMP-9 i proteaz serynowych (katepsyna K, B i L), wydzielanych przez osteoklasty. W wyniku procesu resorpcji na powierzchni beleczek kostnych tworzą się zatoki resorpcyjne Howshipa [62, 99]. Osteoklasty wydzielają enzymy – hydrolazy, które rozkładają organiczne składniki kości i fagocytują je. Wśród hydrolaz osteoklastów nie ma jednak kolagenazy, która jest wydzielana przez osteoblasty.

Pompują do swojego otoczenia  $H^+$  i  $Cl^-$ , zakwaszając je i w ten sposób przyczyniają się do usuwania elementów mineralnych kości. Ponieważ osteoklasty nie mają także receptorów dla parathormonu i witaminy D (mają je osteoblasty), niszczenie

kości przez osteoklasty odbywa się we współdziałaniu z osteoblastami po połączeniu tych komórek za pośrednictwem receptorów RANK z RANKL.

Czynność osteoklastów nasila się również pod wpływem cytokin wydzielanych przez limfocyty T [6, 103, 129].

Faza resorpcji kończy się usunięciem produktów katabolizmu. Osteoklasty zaangażowane w proces resorpcji, po jego zakończeniu ulegają apoptozie lub przechodzą w stan uśpienia (ryc. 7).



**Rycina 7.** Proces aktywacji, różnicowania osteoblastów w procesie resorpcji tkanki kostnej [141]

**Figure 7.** The process of activation, differentiation of osteoblasts in the bone resorption process [141]

### 1.6. Klasyfikacja kieszonek retrakcyjnych

Sade i wsp. wprowadzili w 1976 roku pierwszą klasyfikację KR [124], natomiast ostatnia została zaproponowana w 2007 roku przez Borgsteina i wsp. [20]. Od 1976 roku przedstawiono 12 różnych klasyfikacji kieszonek retrakcyjnych. Wyróżnia się trzy główne rodzaje tej choroby: atelektazja, retrakcja części napiętej i retrakcja części wiotkiej błony bębenkowej. Niektóre z tych klasyfikacji są używane w celu monitorowania zmian zachodzących w błonie bębenkowej [105].

W klasyfikacji Arsa elementem różnicującym jest ruchomość kieszonki: ruchome lub nieruchome kieszonki retrakcyjne.

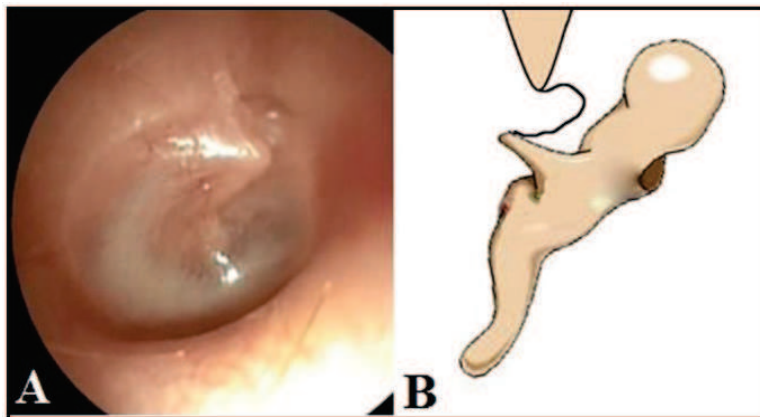
W przypadku kieszonek powstających w części wiotkiej błony bębenkowej stosuje się 4-stopniową klasyfikację Tosa:

Stopień I. Łagodna retrakcja - obecne powietrze pomiędzy szyjką młoteczka a błoną Schrapnella (ryc. 8).

Stopień II. Zrosty części wiotkiej z szyjką młoteczka (ryc. 9).

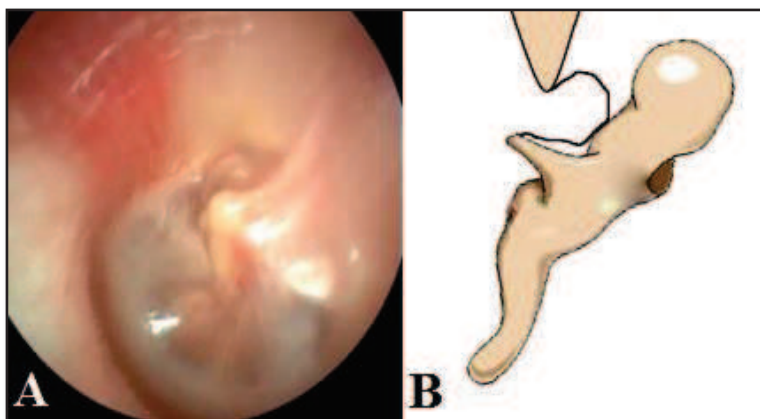
Stopień III. Nasiloną retrakcja z niewielką resorpcją kości bocznej ściany nadbębenka (ryc. 10).

Stopień IV. Retrakcja ze znaczną resorpcją kości bocznej ściany nadbębenka (ryc. 11).



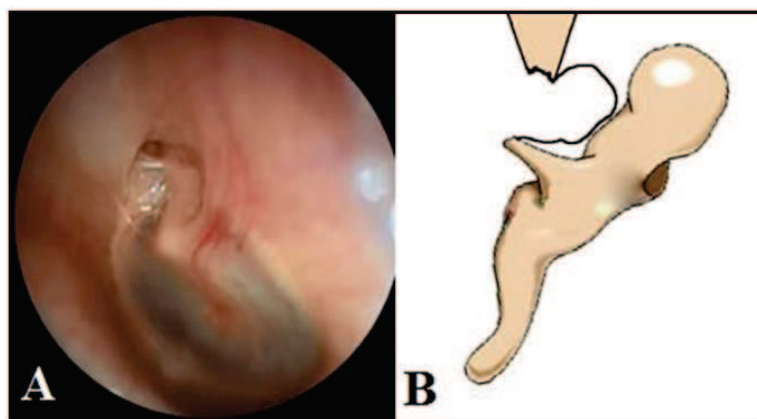
**Rycina 8.** Widok błony bębenkowej z retrakcją I stopnia wg Tosa: A. Obraz endoskopowy. B. Schemat retrakcji błony bębenkowej

**Figure 8.** The view of eardrum RP I-st degree acc. Tos: A. Endoscopic image. B. Scheme of the tympanic membrane retraction



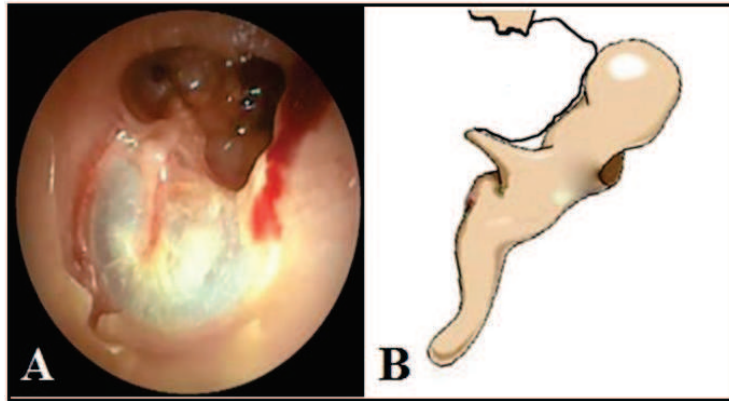
**Rycina 9.** Widok błony bębenkowej z retrakcją II stopnia wg Tosa: A. Obraz endoskopowy. B. Schemat retrakcji błony bębenkowej

**Figure 9.** The view of eardrum RP II degree acc. Tos: A. Endoscopic image. B. Scheme of the tympanic membrane retraction



**Rycina 10.** Widok błony bębenkowej z retrakcją III stopnia wg Tosa: A. Obraz endoskopowy. B. Schemat retrakcji błony bębenkowej

**Figure 10.** The view of eardrum RP III degree acc. Tos: A. Endoscopic image. B. Scheme of the tympanic membrane retraction



**Rycina 11.** Widok błony bębenkowej z retrakcją IV stopnia wg Tosa: A. Obraz endoskopowy. B. Schemat retrakcji błony bębenkowej

**Figure 11.** The view of eardrum RP IV degree acc. Tos: A. Endoscopic image. B. Scheme of the tympanic membrane retraction

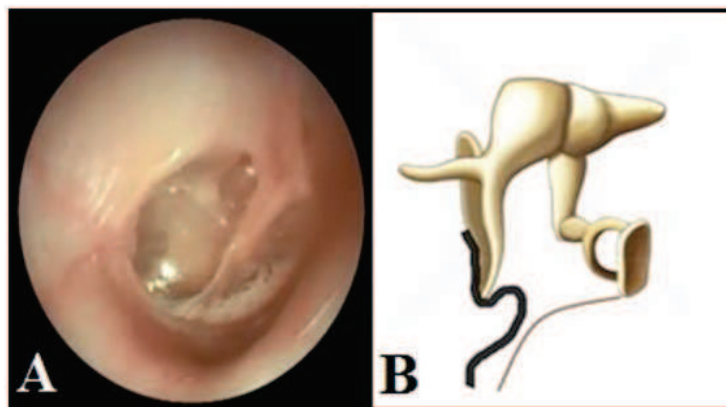
W kieszonkach retrakcyjnych części napiętej błony bębenkowej stosowana jest 4-stopniowa klasyfikacja Sade (1976):

Stopień I. Błona bębenkowa dyskretnie uwypuklona przyśrodkowo w kierunku jamy bębenkowej (ryc. 12).

Stopień II. Wpuklenie błony bębenkowej, która obejmuje kowadełko i strzemiączko, erozja wyrostka soczewkowatego kowadełka (ryc. 13).

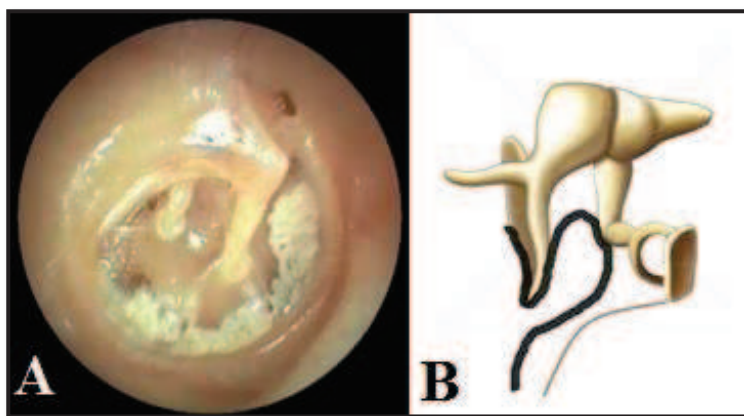
Stopień III. Znaczne wpuklenie błony bębenkowej. Kieszonka przylega, ale nie zra-  
sta się ze wzgórkami (ryc. 14).

Stopień IV. Kieszonka retrakcyjna zra-  
sta się ze wzgórkami (ryc. 15).



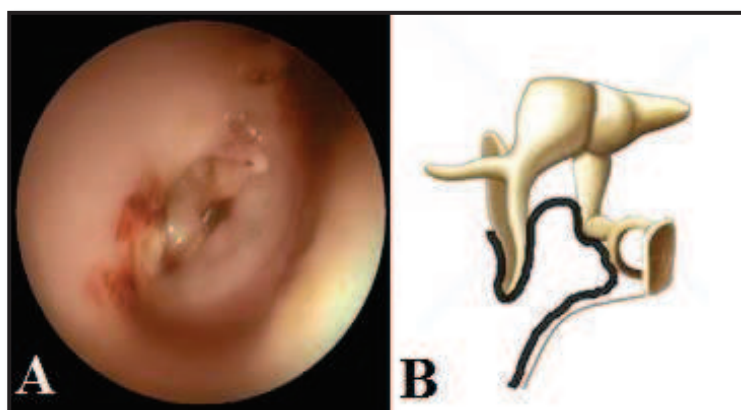
**Rycina 12.** Retrakcja części napiętej błony bębenkowej I stopnia wg Sade: A. Obraz endoskopowy. B. Schemat retrakcji błony bębenkowej

**Figure 12.** The view of eardrum RP I-st degree acc. Sade: A. Endoscopic image. B. Scheme of the tympanic membrane retraction



**Rycina 13.** Retrakcja części napiętej błony bębenkowej II stopnia wg Sade: A. Obraz endoskopowy. B. Schemat retrakcji błony bębenkowej

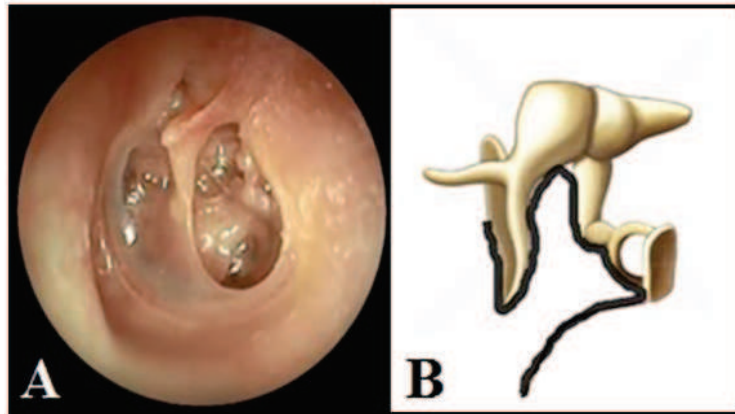
**Figure 13.** The view of eardrum RP II degree acc. Sade: A. Endoscopic image. B. Scheme of the tympanic membrane retraction



**Rycina 14.** Retrakcja części napiętej błony bębenkowej III stopnia wg Sade: A. Obraz endoskopowy. B. Schemat retrakcji błony bębenkowej

**Figure 14.** The view of eardrum RP III degree acc. Sade: A. Endoscopic image. B. Scheme of the tympanic membrane retraction





**Rycina 15.** Retrakcja części napiętej błony bębenkowej IV stopnia wg Sade: A. Obraz endoskopowy. B. Schemat retrakcji błony bębenkowej

**Figure 15.** The view of eardrum RP IV degree acc. Sade: A. Endoscopic image. B. Scheme of the tympanic membrane retraction

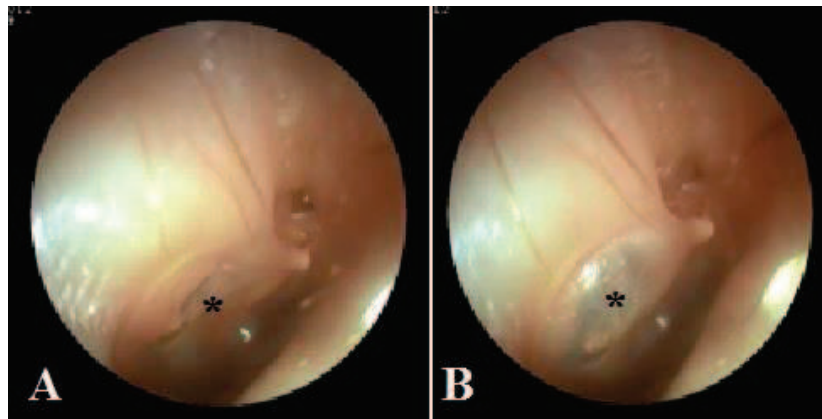
Inne klasyfikacje kieszonek retrakcyjnych to:

- Klasyfikacja KR wg Charachon (1992) [33, 105]:

1 stadium: kieszonka retrakcyjna ruchoma (ryc. 16).

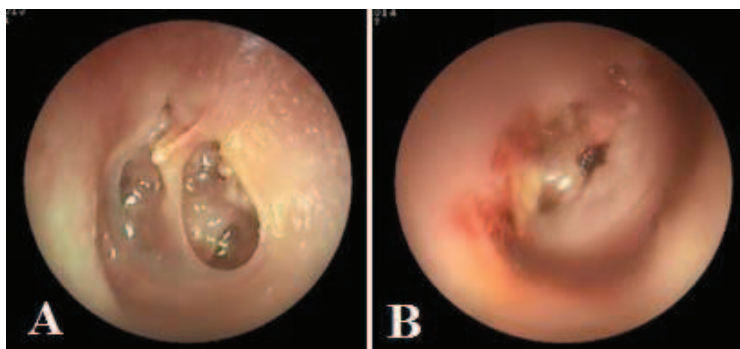
2 stadium: kieszonka zrośnięta, kontrolowana KR (ryc. 17A).

3 stadium: kieszonka zrośnięta, niekontrolowana KR (ryc. 17B).



**Rycina 16.** Kieszonka retrakcyjna I stadium wg Charachon: A. Kieszonka retrakcyjna podczas otoskopii .B. Kieszonka retrakcyjna podczas wykonania próby Valsalvy

**Figure 16.** The view of eardrum RP (\*) I degree acc. Charachon A. Retraction pocket in otoscopy. B. Reposition of the retraction pocket during Valsalva maneuver execution



**Rycina 17.** A. Kieszonka retrakcyjna II stadium B. III stadium (wg Charachon)

**Figure 17.** The view of eardrum RP: A. II degree acc. Charachon. B. III degree acc. Charachon

- Klasyfikacja kieszonek retrakcyjnych u dzieci wg Borgsteina (2007) (ryc. 18) [20]:

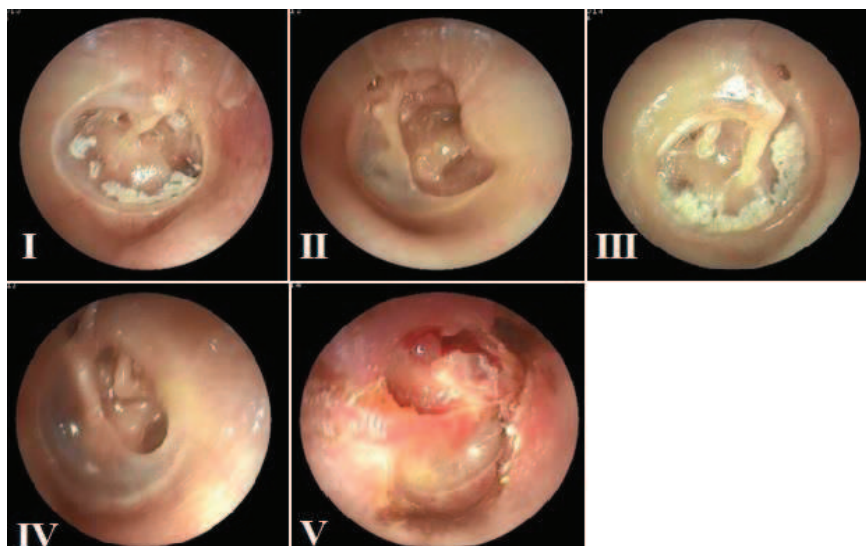
Stopień I. zanik błony bębenkowej bez retrakcji (wciągnięcia)

Stopień II. kieszonka zrośnięta ze wzgórkem (promontorium)

Stopień III. kieszonka zrośnięta z kowadełkiem i/ lub strzemiączkiem

Stopień IV. kieszonka zrośnięta ze wszystkimi kosteczkami słuchowymi, ale brak cech perlaka

Stopień V. kieszonka z perlakiem i/ lub destrukcją kości PSZ.



**Rycina 18.** Kieszonki retrakcyjne u dzieci wg Borgsteina oznakowane odpowiednim stopniem zaawansowania. I, III, V – ucho prawe. II, IV – ucho lewe

**Figure 18.** The view eardrum RP acc. Borgstein (2007) marked appropriately degree: I, III, V – right ear .II, IV – the left ear

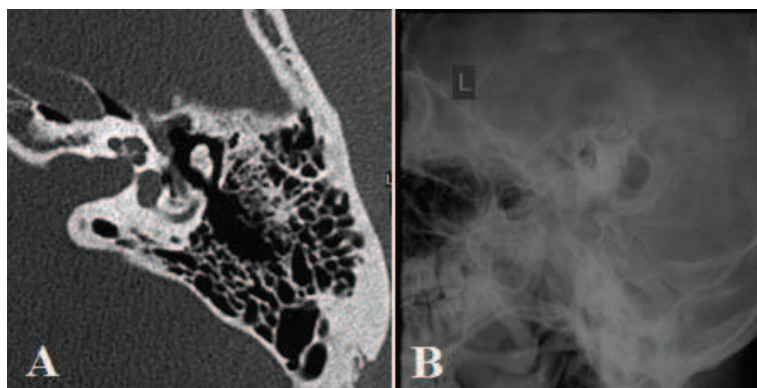
### 1.7. Objawy, diagnostyka i leczenie przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną

Najczęstszym objawem przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną jest niedosłuch typu przewodzeniowego o różnym stopniu nasilenia. W części przypadków występuje niedosłuch mieszany różnego stopnia. W zaawansowanych stadiach rozwoju KR oraz w przypadku rozwoju perlaka pojawiają się objawy takie jak cuchnący, ropny wyciek z ucha, zatkanie ucha, pogłębiający się niedosłuch, bóle ucha, przemijające zawroty głowy [9, 26, 37, 149]. Wyciek z ucha może być niezauważony w ciągu dnia i pacjent stwierdza tylko jego ślady na poduszce po nocy. Zawroty głowy czy ból ucha występują rzadko w tej chorobie i są sygnałem świadczącym o rozwoju powikłania, chociaż schorzenie to nie jest obarczone wysokim ryzykiem powikłań wewnątrz skroniowych czy wewnątrzczaszkowych. Zawroty głowy po dostaniu się wody do ucha najczęściej są związane z perforacją błony bębenkowej.

Należy podkreślić, że kieszonka retrakcyjna nie jest odrębną jednostką chorobową, lecz elementem przewlekłego zapalenia ucha środkowego, u podstawy którego leży zaburzenie wentylacji ucha środkowego. Cechą istotną jest ewolucyjny charakter kieszonki retrakcyjnej w kierunku samowyleczenia, stabilizacji, jak i przekształcenia w perlakowe zapalenie ucha środkowego.

Diagnostyka kieszonki retrakcyjnej:

- Otoskopia z użyciem mikroskopu operacyjnego (mikrootoskopia) jest podstawowym badaniem otolaryngologicznym w procesie diagnostyki KR. Pozwala różnicować atelektazję, kieszonkę retrakcyjną i perforację błony bębenkowej i właściwie zakwalifikować stwierdzone zmiany [14, 56].
  - Próby Toynbee'ego i Valsalvy są pomocne w ocenie ruchomości BB i określenia stopnia zaawansowania KR (różnicowanie III i IV stopnia wg Sade, I i II stadium wg Charachon) [26, 59, 159].
  - Otoskopia pneumatyczna jest przydatna w przypadku niemożności wykonania mikrootoskopii. Pozwala ona na ocenę stopnia ruchomości błony bębenkowej, szczególnie w zaawansowanych stadiach KR bądź atelektazji. Wykonuje się z zastosowaniem lupy usznej Siegla [5, 21, 26, 159].
  - Badanie audiologiczne jest rutynowo wykonywane w trakcie diagnostyki przewlekłego zapalenia ucha środkowego. Audiometria tonalna pozwala określić stronność, typ i stopień niedosłuchu. Audiometria impedancyjna (tympanometria) pozwala uzyskać dodatkową informację o stanie jamy bębenkowej (poziomu ciśnienia w jamie bębenkowej), błony bębenkowej oraz określić odruchy strzemiączkowe [106, 159].



**Rycina 19.** Badanie obrazowe kości skroniowej: A. TK HR. Ucho lewe. B. Zdjęcie wg Schullera. Ucho lewe

**Figure 19.** Imaging of the temporal bone: A CT HR. Left ear. B. X-ray by Schuller. Left ear

Badania obrazowe (zdjęcie wg Schullera, tomografia komputerowa (TK HR) kości skroniowych) odgrywają mniejszą rolę w postępowaniu diagnostycznym przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną (ryc. 19). Przydatne są one w ocenie stanu ścian kostnych nadbębienka i ściany bocznej nadbębienka oraz określenia stopnia destrukcji kości [2, 97].

Postępowanie kliniczne:

1. Obserwacja (bezobjawowy przebieg choroby) [31, 59, 107, 159].

2. Leczenie zachowawcze:

- leczenie farmakologiczne (steroidy donosowo, doustnie; antybiotyki; pseudoefedryna, leki przeciwhistaminowe, mukolityki, krople obkurczające błonę śluzową nosa) [33, 120, 126, 149].

Steroidy stosuje się celem zmniejszenia obrzęku błony śluzowej w okolicy ujścia trąbki słuchowej i nosogardła, zmniejszenia ilości płynu wysiękowego w jamie bębnekowej, w przypadkach alergicznego nieżytu nosa. Antybiotyki stosuje się celem eradykacji infekcji bakteryjnej w obrębie górnych dróg oddechowych, szczególnie jamy nosa i części nosowej gardła, w przebiegu ostrych i przewlekłych stanów zapalnych [19, 26].

- zabiegi nieinwazyjne (próba Valsalvy, Politzera, zestaw Otovent).

3. Leczenie chirurgiczne chorób nosa i zatok przynosowych (adenotomia usunięcie polipów nosa i zatok przynosowych).

4. Leczenie chorób trąbki słuchowej (zachowawcze, chirurgiczne) [31, 59, 100].

5. Leczenie chirurgiczne przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną.

Powstanie kieszonki retrakcyjnej może spowodować częściową lub całkowitą destrukcję kosteczek słuchowych i powstanie perlaka, co z kolei powoduje niedosłuch.

Wśród metod leczenia chirurgicznego stosuje się:

- Myringoplastyka: metoda polega na wycięciu zmienionej części błony bębenkowej i odtworzeniu jej przy pomocy przeszczepu powięziowego lub chrząstnowego. Celem tego leczenia jest usunięcie kieszonki retrakcyjnej, naskórka i płynu z jamy bębenkowej oraz polepszenie wentylacji ucha środkowego. Stosuje się w przypadku małych KR (I i II stopnia wg Charachon). Zabieg może być wykonany w znieczuleniu miejscowym.

- Paracenteza z założeniem drenów wentylacyjnych: najczęściej wykonywana metoda w leczeniu KR oraz wysiękowego zapalenia uszu (ryc. 20). U osób dorosłych zabieg wykonuje się w znieczuleniu miejscowym, u dzieci – w znieczuleniu ogólnym. Celem operacji jest założenie drenu wentylacyjnego w przednim lub tylnodolnym kwadrancie błony bębenkowej. Metoda ma zastosowanie w leczeniu KR we wczesnym stopniu zaawansowania.

- Tympanektomia (myringektomia) – metoda polegająca na całkowitym usunięciu zmienionej błony bębenkowej, pozostawiając powstały w ten sposób ubytek do samoistnego wygojenia. Stosuje się w leczeniu KR od II stopnia. Metoda została zaproponowana przez chilijską szkołę otolaryngologiczną [55]. Uważa się, że ubytek błony bębenkowej ma wysokie zdolności do regeneracji (podobno jak perforacja pourazowa) i nie wymaga plastyki błony bębenkowej.



**Rycina 20.** Obraz otoskopowy błony bębenkowej z retrakcją po założeniu drenika wentylacyjnego. Ucho prawe

**Figure 20.** Otoscopy. The view of eardrum after the implantation of ventilation tube. Right ear

- Tympanoplastyka – polega na usunięciu zmienionej błony bębenkowej z zamknięciem jej ubytku za pomocą płatów chrzęstnych (ze skrawka małżowiny usznej) lub powięziowych (powięź mięśnia skroniowego).

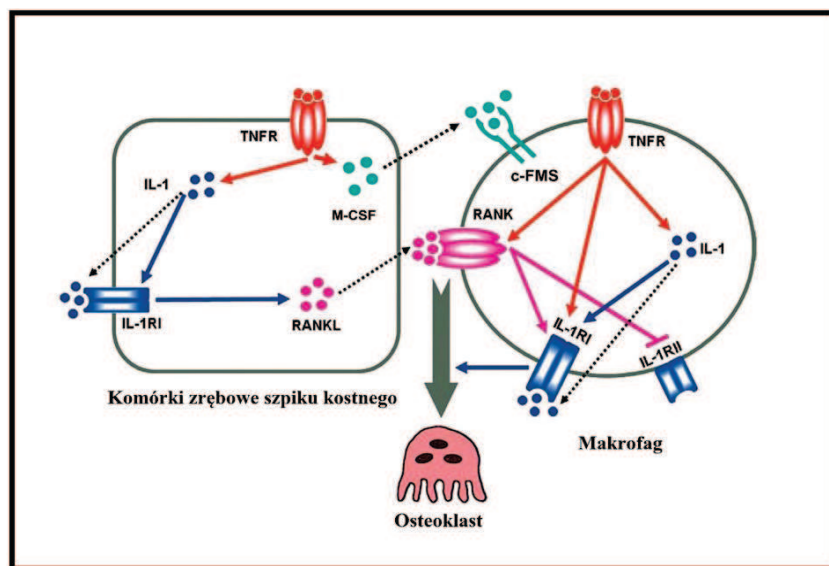
- Tympanomastoidektomia. Technika jest stosowana w przypadku dużej KR w tylnogórnym kwadrancie błony bębenkowej, z głęboko zlokalizowanym, niewidocznym dnem kieszonki (tzw. kieszonka niekontrolowana) i/lub z destrukcją bocznej ściany nadbębenka oraz podejrzeniu perlaka [12, 26, 38].

Należy też leczyć choroby predysponujące do powstania kieszonki retrakcyjnej – przede wszystkim choroby prowadzące do niedrożności trąbki słuchowej, która przez swoją komunikację z nosogardłem umożliwia wyrównywanie ciśnienia w uchu środkowym i zapobiega wciąganiu błony bębenkowej. Chodzi głównie o skrzywienie przegrody nosa, przewlekłe zapalenie zatok przynosowych z polipami, przerost migdałka gardłowego. Trzeba podjąć najlepsze, rekomendowane metody leczenia chirurgicznego.

## 1.8. Omówienie badanych cytokin

**TNF- $\alpha$  (kachektyna, kacheksyna). Czynn timer martwicy nowotworu.** Cytokina ta pochodzi z nadrodziny TNFSFL wpływa na proces zapalny. Produkowana jest głównie przez aktywne monocyty i makrofagi oraz w znacznie mniejszych ilościach przez inne komórki (adipocyty, keratynocyty, fibroblasty, neutrofile, mastocyty oraz niektóre limfocyty). Jest jedną z głównych cytokin, biorącą udział w odpowiedzi zapalnej i immunologicznej. Cytokina ta jest kodowana przez geny TNFA, należące do grupy głównego układu zgodności tkankowej MHC III, który zlokalizowany jest w pozycji 6p21.3. Z biochemicznego punktu widzenia, cytokina ta jest to glikoproteina, zbudowaną z 212 aminokwasów (wolna forma rozpuszczalna składa się z 182 aminokwasów). Istnieją dwie formy TNF- $\alpha$ , obie wykazują aktywność biologiczną. Istnieją też inne jej izoformy wytwarzane w innych tkankach [78, 101, 146].

TNF- $\alpha$  wykazuje swoje działanie na komórki poprzez połączenie się z odpowiednim receptorem (TNF-R1 (białko p55) lub TNF-R2 (białko p75), umiejscowione na powierzchni błony komórkowej. Receptory te znaleziono między innymi na powierzchni komórek immunokompetentnych. Pobudzenie tych receptorów (TNF-R1 i TNF-R2) pobudza komórki immunokompetentne do produkcji i uwalniania cytokin (ryc. 21) [146, 153].



**Rycina 21.** Schemat osteoklastogenezy, indukowany przez TNF- $\alpha$  [138]  
**Figure 21.** Scheme of mechanism of osteoclastogenesis induced by TNF- $\alpha$  [138]

Lipopolisacharydy (LPS), interleukina 1 (IL-1) i interferon gamma (INF- $\gamma$ ) stymulują produkcję TNF- $\alpha$ . Wytwarzanie tej cytokiny może być pobudzone autokrynnie (tj. przez sam TNF- $\alpha$ ). TNF- $\alpha$  współdziała przy stymulacji różnicowania limfocytów B, limfocytów T, komórek NK, a także stymuluje cytotoksyczność monocytów, makrofagów, eozynofili i neutrofilii. TNF- $\alpha$  wykazuje właściwości przeciwnowotworowe, może indukować apoptozę komórek raka lub hamować ich proliferację, hamuje angiogenezę nowo powstających naczyń guza. Poprzez powyższe receptory komórkowe uruchomiona zostaje kaskada kwasu arachidonowego, na skutek czego wzrasta wewnątrzkomórkowe stężenie wolnych rodników, co prowadzi do śmierci komórki nowotworowej [104, 111].

Kolejnym efektem działania TNF- $\alpha$  jest pobudzenie wątroby do produkcji białek ostrej fazy, a działając na podwzgórze - przyczynia się do wzrostu temperatury ciała. Bierze ona udział w stymulacji wytwarzania fibroblastów i osteoblastów, przyczynia się do wzrostu oporności na insulinę. Nagłe podwyższenie stężenia tej cytokiny może być przyczyną wstrząsu septycznego, a przewlekłe utrzymujący się wysoki poziom może doprowadzić do wyniszczenia [67, 80].

Wysokie stężenie TNF- $\alpha$  odgrywa bardzo ważną rolę w patogenezie chorób autoimmunologicznych. Inhibitory TNF- $\alpha$  stosuje się w leczeniu niektórych przypadków reumatoidalnego zapalenia stawów, zeszywniającego zapalenia stawów, łuszczycy oraz astmy oskrzelowej. W tym celu wykorzystuje się przeciwciała monoklonalne, takie jak Infliximab (Remicade), Adalimumab (Humira) lub Certolizumab (Cimzia), lub białka związane z krążącym receptorem (Etanercept, Enbrel) [6, 78, 94, 101].

**IL-1 $\alpha$  (alfa)**

Interleukina 1 (IL-1) – jest to zbiorcza nazwa, którą określa się cytokiny o kluczowym znaczeniu dla procesu zapalnego i szerokim spektrum działania. Znana jest także jako czynnik aktywujący fibroblasty (FAF), czynnik aktywujący limfocyty (LAF), endogenny mediator limfocytów (LEM), tymocytowy czynnik aktywujący komórki pochodzących z (*ETAF*), hepatocytowy czynnik stymulujący lub induktor surowiczy amyloidu A (HSP), catabolin, hemopoetyna-1 (H-1), endogenny czynnik gorączkowy (EP), czynnik aktywujący osteoklasty (OAF) i czynnik wywołujący proteolizę (PIF) [41, 94].

IL-1 produkowana jest głównie przez aktywowane makrofagi, neutrofile oraz komórki nabłonkowe. Swoje działanie wykazuje poprzez stymulację IL-1 zależnych receptorów. Wydzielana cytokina jest w odpowiedzi na różne antygeny pochodzenia wirusowego, bakteryjnego i grzybiczego. Oprócz komórek układu odpornościowego wydzielać ją mogą także komórki "nieimmunologiczne", takie jak keratynocyty, co podkreśla jej rolę uniwersalnego czynnika, pobudzającego proces zapalny. IL-1 bierze także udział w indukowaniu wydzielania innych cytokin prozapalnych, takich jak: interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukina 6 (IL-6) czy TNF- $\alpha$ . IL-1 wpływa również na procesy odpowiedzi swoistej, indukując wydzielanie IL-6 przez limfocyty T oraz wpływając na rozwój limfocytów B. Ogólnie mówiąc, IL-1 ma wpływ aktywujący na leukocyty oraz wiele innych komórek, nie związanych bezpośrednio z układem odpornościowym. Bierze także udział w przebudowie tkanek, syntezie białek ostrej fazy oraz wywołuje senność i jest pirogenem [109, 116].

Wśród znanych 10 różnych wariantów IL-1 najbardziej istotne są trzy:

- IL-1 $\alpha$ , występująca głównie jako cząsteczka błonowa oddziałująca jedynie na komórki sąsiadujące z komórką, która tę cytokinę wytwarza,
- IL-1 $\beta$ , odpowiedzialna za efekty wywoływane przez IL-1,
- IL-1 $\gamma$ , opisywana obecnie jako Interleukina 18.

Ze względu na jej własności przeciwnowotworowe, IL-1 jest obecnie intensywnie badana jako potencjalny lek. Jednak jej silne własności prozapalne i pirogenne powodują, że jej bezpośrednie zastosowanie jest dosyć trudne. Próbuje się stosować związki pochodne, nie wykazujące efektów ubocznych [95].

Istotną rolę IL-1 $\alpha$  odgrywa w utrzymaniu funkcji bariery ochronnej skóry [116, 119].

Z wyjątkiem keratynocytów skóry, niektórych komórek nabłonka i ośrodkowego układu nerwowego, mRNA kodującego IL-1 $\alpha$  nie obserwuje się w większości typów zdrowych komórek ciała, tkankach i krwi. Jednak liczne komórki po stymulacji mogą być indukowane do transkrypcji genów IL-1 $\alpha$  i tworzyć postać prekursora IL-1 $\alpha$ . Wśród nich są fibroblasty, granulocyty, makrofagi, eozynofile, komórki tuczne i granulocyty zasadochłonne, komórki śródbłonka, monocyty, płytki krwi, szpiku i linie komórkowe limfocytów T i limfocytów B, astrocyty, komórki mezangialne nerki, komórki Langerhansa, komórki dendrytyczne, komórki-NK, ziarniste limfocyty, neutrofile i wiele innych typów komórek [6, 41, 52, 78, 94].

IL-1 $\alpha$  wykazuje następujące działania biologiczne w komórkach:

- stymuluje keratynocyty i makrofagi do wydzielania IL-1 $\alpha$ ,



- indukuje syntezę prokolagenu typu I i III,
- powoduje proliferację fibroblastów, pobudza wydzielanie kolagenazy, indukuje sekrecję IL-6,
- indukuje syntezę cyklooksygenazy oraz uwalnianie prostaglandyny E2 (PGE2),
- powoduje fosforylację białka szoku cieplnego,
- powoduje proliferację komórek mięśni gładkich, keratynocytów i stymuluje uwalnianie innych cytokin przez keratynocyty,
- indukuje uwalnianie TNF- $\alpha$  przez komórki śródbłonna i jonów wapnia z osteoklastów,
- stymuluje wydzielanie białek ostrej fazy przez hepatocyty,
- indukuje proliferację komórek CD4+, IL-2, ko-stymuluje komórki CD8+/ IL-1R+,
- indukuje proliferację dojrzałych komórek B i wydzielanie immunoglobulin.

Wkrótce po wystąpieniu zakażenia w organizmie, IL-1 $\alpha$  aktywuje szereg procesów odpowiedzi immunologicznej, w szczególności:

- stymuluje proliferację fibroblastów,
- indukuje syntezę proteaz, uwolnienie wszystkich rodzajów aminokwasów we krwi i stymuluje syntezę białek ostrej fazy,
- powoduje zmianę zawartości jonów w osoczu, zwiększając stężenie miedzi i cynku oraz zmniejszając zawartość żelaza w krwi,
- zwiększenie liczby granulocytów obojętnochłonnych we krwi,
- aktywuje proliferację limfocytów, wywołuje gorączkę.

Działając miejscowo IL-1 $\alpha$  pobudza ekspresję FGF, EGF oraz proliferację fibroblastów i keratynocytów. Obecność zwiększonego stężenia prekursora IL-1 $\alpha$  w keratynocytach sugeruje, że miejscowo uwalniana IL-1 $\alpha$  może odgrywać ważną rolę w regeneracji tkanek i przyspieszać gojenie się ran. Badania kliniczne w dermatologii dotyczące zastosowania miejscowego IL-1 $\alpha$  wykazały zwiększenie produkcji kolagenu i innych składników matrycy skóry [95, 116].

### **Interleukina 6 (IL-6)**

To jedna z najważniejszych i najbardziej wielokierunkowo działających cytokin. Może pełnić rolę prozapalnej cytokiny, jak i przeciwzapalnej miokiny. Wywiera swoje działanie poprzez interakcję z receptorem interleukiny 6 i glikoproteiną 130. Wcześniej była znana jako interferon  $\beta$ 2 (beta2), czynnikiem 2 stymulującym limfocyty B lub czynnikiem wzrostu hybrydoma. U ludzi kodowana jest przez gen IL6. Produkowana jest przez makrofagi i monocyty. W nieznacznej ilości wydzielana jest również przez fibroblasty, keratynocyty, osteoblasty, komórki mięśni gładkich naczyń, chondrocyty oraz limfocyty T i B. Produkcja interleukiny-6 stymulowana jest przez interferon (IF), czynnik martwicy nowotworu (TNF), interleukinę 1 (IL-1), lipopolisacharydy oraz wirusy.

IL-6 współuczestniczy w odpowiedzi zapalnej organizmu. Wpływa na ostateczne przekształcenie limfocytów B do komórek plazmatycznych przyczyniając się do produkcji odpowiedniej klasy przeciwciał. IL-6 wraz z IL-1 stymulują aktywację limfocytów T, co sprzyja rozpoznawaniu antygenów atakujących organizm. W doświadczeniu na myszach wykazano, że defekt genu kodującego skutkowało obniżeniem odporności przeciw *Streptococcus pneumoniae* [145]. Ponadto, osteoblasty wydzielają IL-6, czym stymulują tworzenie osteoklastów. Obserwacja ta przyczyniła się do zainicjowania leczenia tym sposobem osteoporozy. Estrogeny, jako inhibitory IL-6, podawane są pacjentkom w okresie pomenopauzalnym między innymi celem spowolnienia procesu destrukcji kości. Komórki mięśni gładkich błony środkowej w wielu naczyniach krwionośnych również wytwarzają IL-6. Rola IL-6 jako cytokiny przeciwzapalnej jest związana z jego hamującym działaniem na TNF-alfa i IL-1 i aktywacji IL-1 $\alpha$  i IL-10.

Wykazano, że IL-6 jest jednym z mediatorów pobudzających produkcję białek ostrej fazy. Białko C-reaktywne (CRP), haptoglobina, alfa-1-antytrypsyna, ceruloplazmina, składowe dopełniacza C3 i alfa-2-antytrypsyny, po stymulacji przez interleukinę-6, wytwarzane są w większości w wątrobie, choć również przez komórki śródbłonna, adipocyty oraz fibroblasty. Produkcja przez adipocyty może wyjaśniać podwyższony poziom białka CRP obserwowany u osób otyłych [13].

IL-6 jest jednym z najważniejszych czynników pirogennych. Przenika przez barierę krew-mózg i stymuluje wytwarzanie PGE2 w podwzgórzu, wykazując wpływ na termoregulację organizmu. W mięśniach i w tkance tłuszczowej ta interleukina stymuluje wytwarzanie energii, co skutkuje zwiększeniem temperatury ciała.

IL-6 uznaje się też za miokinę, cytokinę produkowaną przez mięśnie, zwłaszcza podczas ich skurczu. Podczas wysiłku interleukina-6 działa podobnie do hormonów poprzez mobilizację substancji zewnątrzkomórkowych i zwiększenie dopływu substancji odżywczych do mięśni. IL-6 wykazuje synergizm w stosunku do interleukiny 3 (IL-3), co powoduje pobudzenie procesów hematopoezy i różnicowanie komórek macierzystych [110].

Wykazano związek IL-6 z takimi chorobami, jak: cukrzyca [76], miażdżyca [151], reumatoidalne zapalenie stawów [135], czerniak złośliwy [117], rak gruczołu krokowego [157]. Trwają badania nad zastosowaniem terapii przeciw IL-6 w tych chorobach [65]. Dotychczas jedynie Tocilizumab został dopuszczony do użytku w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów, natomiast lek oznaczony jako ALD518 jest w trakcie badań klinicznych [70, 135].

## IL-10

Interleukina 10 (IL-10), inaczej czynnik hamujący syntezę cytokin to cytokina przeciwzapalna, która hamuje wytwarzanie cytokin prozapalnych takich, jak interferon-gamma, IL-2, IL-3, TNF- $\alpha$  czy GM-CSF. U ludzi kodowana jest przez gen *IL-10* znajdujący się na chromosomie 1. Należy do grupy cytokin przeciwzapalnych razem z interleukiną 19 (IL-19), interleukiną 20 (IL-20), interleukiną 22 (IL-22), interleukiną 24 (IL-24), interleukiną 26 (IL-26), interferonami (IF- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\epsilon$ , - $\kappa$ , - $\omega$ , - $\delta$ , - $\tau$  i - $\gamma$ ) oraz cząsteczkami podobnymi do interferonu (limitin, IL-28A, IL-28B i IL-29). IL-10 pod względem budowy jest

homodimerem, a każda z jednostek składa się ze 178 aminokwasów. W większości wytwarzana jest przez monocyty, częściowo przez Th2 limfocyty, mastocyty i pobudzone komórki B i T. Samoistna ekspresja IL-10 jest minimalna i wymaga pobudzenia przez florę patologiczną [52, 75, 89]. Receptory dla interleukiny-10 znajdują się na powierzchni komórek NK, limfocytach, monocytach, komórkach tucznych oraz komórkach endotelialnych.

Podczas infekcji wirusowej cytokina ta uczestniczy w odpowiedzi immunologicznej, działając hamująco na komórki NK, obniża ekspresję cytokin Th1, antygenów MHC klasy II i cząsteczek współstymulujących makrofagi. Dodatkowo zwiększa przeżywalność komórek B, stymuluje ich proliferację i produkcję antygenów [78, 89, 94].

Poprzez hamowanie odbywającej się w makrofagach i komórkach T syntezy cytokin prozapalnych, zwłaszcza interferonu gamma, IL-3, IL-4 i TNF- $\alpha$  i czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (GM-CSF), ujawnia się przeciwzapalna funkcja IL-10. Także pod wpływem IL-10 ulega supresji możliwość prezentacji antygenów przez komórki układu immunologicznego [25, 41, 49].

IL-10 bierze udział w ostrej chorobie „przeszczep przeciwko gospodarzowi” (GVHD). Obecność odmiany genu IL10 u biorcy znacząco obniża ryzyko wystąpienia GVHD, a znajomość tego genomu pozwala przewidzieć ryzyko wystąpienia tego powikłania [48, 70].

Uważa się, że cytokina ta pełni funkcję immunoregulatora w procesach układu pokarmowego. Wykazano, że podawanie rekombinowanych bakterii, produkujących IL-10, pacjentom z chorobą Crohna łagodzi objawy choroby [63].

U pacjentów ze stwardnieniem rozsianym, którzy otrzymywali IF- $\beta$  (beta) zauważono podwyższony poziom interleukiny-10 w surowicy krwi i w płynie mózgowo-rdzeniowym. Nie wykluczone, że IL-10 może być głównym czynnikiem, odpowiedzialnym za fazę remisji tej choroby [28].

Istotnie obniżony poziom IL-10 w surowicy krwi wykazano u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Dobre wyniki leczenia tej choroby uzyskano stosując IL-10 z Metotrexatem [36].

## **RANKL**

RANKL jest to ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika kappa B – białko uczestniczące w metabolizmie kości (aktywacja osteoklastów), należące do rodziny czynników martwicy nowotworów. U ludzi jest kodowane przez gen *TNFSF11*. Znany jest także jako ligand czynnika martwicy nowotworu nadrodziny receptorów 11 (TNFSF11), TNF-podobna cytokina indukująco-aktywacja (TRAN-CE), ligand osteoprotegeryny (OPGL) oraz czynnik różnicowania osteoklastów (ODF) [16, 42, 43, 77, 81]. RANKL jest wytwarzany przez osteoblastyczną linię komórek (dojrzałe osteoblasty i ich prekursorzy), chondrocyty, fibroblasty, śródbłonek, komórki zrębu szpiku kostnego, komórki nowotworowe oraz aktywne limfocyty T. Stężenie białka RANKL w szpiku kostnym odgrywa kluczową rolę w prawidłowym metabolizmie kości. Jest czynnikiem aktywującym proces tworzenia dojrzałych osteoklastów: różnicowanie, fuzję, funkcjonowanie oraz ich przeżywanie.

Działa poprzez receptor RANK, znajdujący się na powierzchni osteoblastów (ryc. 22) [6, 7, 16, 57, 66, 81, 103, 134, 147]. Jak związana ze ścianą osteoblastów tak i rozpuszczalna postać RANKL (sRANKL) powodują aktywację receptorów RANK. Aktywowane receptory RANK z kolei powodują aktywację szeregu szlaków sygnalizacyjnych, działających przez MAPK (kinazy aktywowane mitogenami), PI3K lub NF- $\kappa$ B, ukierunkowanych na kontrolę osteoklastogenezy. Kinazy MAP uczestniczą w regulacji funkcjonowania czynników transkrypcyjnych z rodziny AP-1 (c-Jun, JunB, c-Fos i Fra), sterujących ekspresją genów niezbędnych do prawidłowego dojrzewania osteoklastów.

TRAFs i inne białka adaptorowe, takie jak Gab2, związane z końcami cytoplazmatycznymi RANK są głównymi mediatorami sygnalizacji RANKL-RANK. RANKL może być stosowany jako regulator genów apoptozy, partner wiążący OPG, ligandem dla receptora RANK. Bierze on udział w sterowaniu procesu proliferacji przez zmianę poziomów białka ID4, ID2 i cykliny D1 [57, 81].

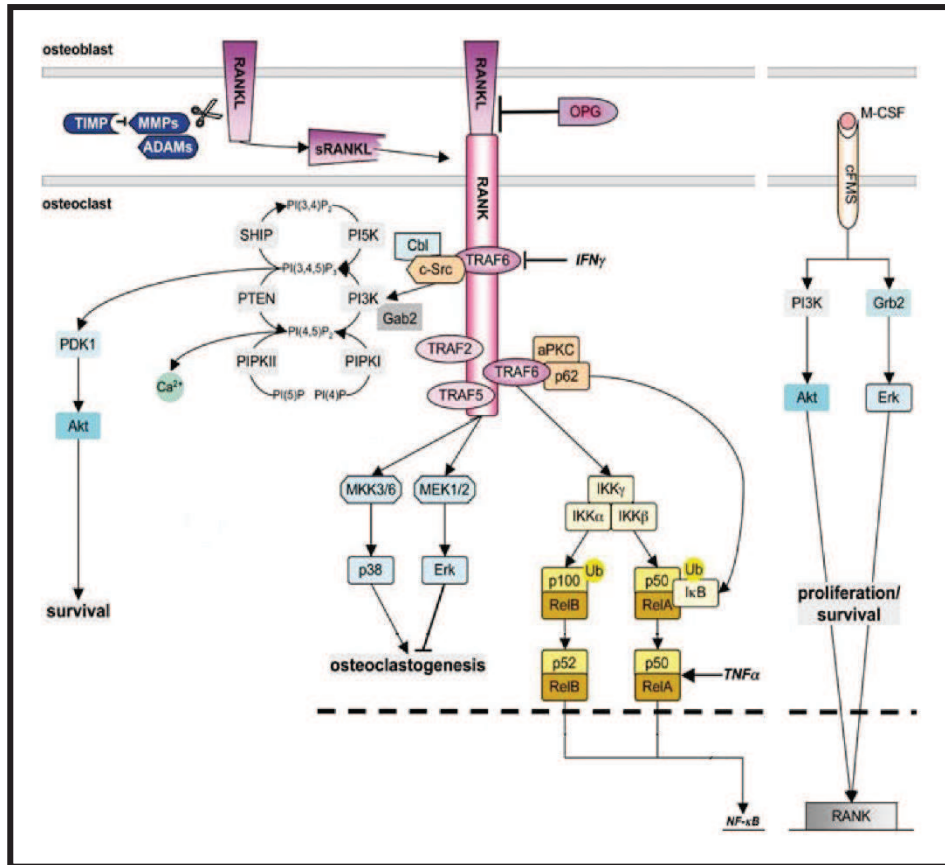
RANKL ulega ekspresji w wielu tkankach i narządach, w tym: w mięśniach szkieletowych, grasicy, wątrobie, okrężnicy, jelicie cienkim, nadnerczu, osteoklastach, komórkach nabłonka gruczołu sutkowego, gruczołu krokowego i trzustki. Szeroka zmienność poziomu ekspresji genów RANKL w narządach potwierdza duże znaczenie tej cytokiny w procesie wzrostu tkanek (w szczególności tkanki kostnej) i funkcji układu odpornościowego organizmu [147, 156, 158].

Poziom ekspresji RANKL nie ma liniowej korelacji z efektem tego ligandu. Wysokie stężenie białka RANKL jest zwykle wykrywane w płucach, grasicy i węzłach chłonnych, a niskie stężenie w szpiku kostnym, żołądku, krwi obwodowej, grasicy, łożysku, leukocytach, sercu, tarczycy i mięśniach szkieletowych [16, 49, 67].

RANKL bierze udział w funkcjonowaniu układu odpornościowego, gdzie działa przez komórki pomocnicze T i jest zaangażowany w procesie dojrzewania komórek dendrytycznych. Białko to może być użyte jako współczynnik przeżycia komórek dendrytycznych i uczestniczy w regulacji zależnej od komórek T odpowiedzi immunologicznej. Aktywacja komórek T jest indukowana wzrostem ekspresji genu RANKL i prowadzi do proliferacji osteoklastów i utraty masy kostnej [16, 41, 43, 103].

Białko RANKL uczestniczy w procesie aktywacji kinazy antyapoptycznej AKT/PKB za pośrednictwem sygnalizacji kompleksu SRC oraz czynnika martwicy nowotworu 6 (TRAF6), co sugeruje, że białko RANKL może odgrywać rolę w regulacji apoptozy [67, 129, 156].

Nadprodukcja RANKL odgrywa rolę w chorobach zwyrodnieniowych kości, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów i artropatia łuszczycowa. Oprócz zwyrodnieniowych chorób kości, białko RANKL stwierdzono w ogniskach przerzutów nowotworowych do kości (szczególnie raka gruczołu krokowego), co pozwala wytłumaczyć niektóre konsekwencje tych przerzutów: hiperkalcemia oraz złamania patologiczne [25, 94, 131, 134, 147, 158].



**Rycina 22.** Schematyczny rysunek szlaków sygnałowych RANKL-RANK, które kontrolują osteoklasty oraz ich aktywację [83]

**Figure 22.** Scheme of the signaling pathways of RANKL-RANK, which control lineage commitment of osteoclasts, and their activation [83]

### MMP-9 (metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9)

Znana także jako kolagenaza kDa typu IV, 92 kDa żelatynaza lub żelatynaza B (GELB), jest grupą zależnych od cynku enzymów proteolitycznych, należących do endopeptydaz, których podstawową funkcją jest uczestniczenie w fizjologicznych i patologicznych procesach przebudowy składników macierzy zewnątrzkomórkowej i degradowanie ich (remodeling) [6, 50, 57, 82, 98]. W swoim składzie zawierają atom cynku ( $Zn^{2+}$ ), który pełni rolę strukturalną i katalityczną w cząsteczce enzymu. Syntetyzowana jest w komórkach w formie preproenzymu i uwalniana do przestrzeni zewnątrzkomórkowej jako proenzym. Enzymy te syntetyzowane są w komórkach i uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w formie nieaktywnej (proMMP). Aktywacja enzymu następuje przez proteolityczne cięcie w rejonie propeptydu.

Aktywność metaloproteaz jest precyzyjnie regulowana na poziomie transkrypcji, translacji oraz poprzez endogenne inhibitory, takie jak  $\alpha 2$ -makroglobulina i tkankowe inhibitory metaloproteinaz [109, 112, 134].

W warunkach fizjologicznych uczestniczą one w procesach takich jak embriogeneza, angiogeneza, gojenie ran, bierze także udział w agregacji płytek, regulują metabolizm jonów. Zmiany aktywności metaloproteaz zaobserwowano w wielu stanach patologicznych takich jak procesy zapalne, choroby degeneracyjne oraz w nowotworach.

Metaloproteinazy odgrywają istotną rolę w progresji nowotworu poprzez pobudzanie wzrostu komórek raka, migrację, inwazję, tworzenie przerzutów i angiogenezę. Wydzielanie i aktywność MMP jest zwiększona prawie we wszystkich typach nowotworów u ludzi i koreluje ze stopniem zaawansowania, większą inwazyjnością, zdolnością do dawania przerzutów, a także z krótszym okresem przeżycia [109, 111, 112]. W badaniach, w których oznaczano aktywność MMP w surowicy, w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz tkance nerwowej chorych na stwardnienie rozsiane, stwierdzono wzrost aktywności MMP-1, -2, -3, -7, -9 oraz MMP-12. Uważa się, że MMP uszkadzają barierę krew-mózg, zwiększając napływ limfocytów do ośrodkowego układu nerwowego oraz biorą udział w degradacji osłonek mielinowych. Powodują również powstawanie aktywnej formy czynnika martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ) [6, 60, 80, 113]. MMP-9 powoduje degradację kolagenu typu IV i V oraz innych białek macierzy zewnątrzkomórkowej, odgrywa rolę w procesie migracji granulocytów przez błonę podstawną. MMP-9 uczestniczy w procesie gojenia nabłonka dróg oddechowych. W połączeniu z TGF- $\beta 1$  pobudza skurcz włókien kolagenu, wspomagając zamknięcie rany [50, 112, 113, 115, 153].

Wzrost stężenia MMP-9 wykazano w wielu procesach patologicznych, w tym nowotworach, chorobach sercowo-naczyniowych i immunologicznych [79, 91, 92].

Jak wynika z powyższego przeglądu omówione cytokiny biorą aktywny udział w procesach zapalnych i dlatego zostały wybrane do zaplanowanych przez nas badań. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej są podejrzewane o odgrywanie istotnej roli w degradacji kości przez degradację kolagenu typu IV błony podstawnej. Ligand receptora aktywatora czynnika jądrowego NF-kappa B (RANKL), czynnik martwicy nowotworów obecne są na powierzchni osteoblastów i są niezbędne w procesie zróżnicowania osteoklastów. Związany z receptorem RANK czynnik RANKL, obecny w osteoklastach, aktywuje kaskadę czynników transkrypcyjnych, promujących osteoklastogenezę i resorpcję tkanki kostnej.

Aktywowane osteoklasty odgrywają ważną rolę w procesie osteolizy. Aktywatorami osteoklastów są cytokiny prozapalne TNF- $\alpha$  i interleukina-1 (IL-1 $\alpha$ ) produkowane przez komórki procesu zapalnego (makrofagi, monocyty, limfocyty T i B). Identyfikacja transkryptu genu TNF- $\alpha$  dowodzi obecności aktywnych osteoklastów i procesu zapalnego w ognisku sklerotycznym. Wzrost ekspresji mRNA TNF- $\alpha$  powoduje wzrost aktywacji osteoklastów, co prowadzi do resorpcji kości, a tym samym do rozwoju choroby kości, na przykład przewodu słuchowego zewnętrznego ucha. W licznych badaniach wykazano wpływ cytokin immunoregulujących (IL-2, IL-6, IL-10) na osteolizę [6, 7, 25, 41, 49, 61, 78].

IL-1, -6 i TNF-alfa są cytokinami, które mogą stymulować osteoklastogenezę w sposób niezależny od RANKL, podczas gdy M-CSF wzmacnia wytwarzanie RANKL przez komórki podścieliska i przedłuża funkcjonowanie osteoklastów, blokując ich apoptozę.

Takie czynniki, jak OPG, TGF- $\beta$ , bifosfoniany, kalcytonina, estrogeny, IL-4, IL-18, IFN- $\gamma$ , FGF-2 (bFGF) hamują powstawanie i aktywność osteoklastów.

Przeciętny czas życia osteoklastów u człowieka wynosi około 2 tygodni, zaś osteoblastów – około 3 miesięcy. Degradacja kości prowadzi do uwalniania z jej macierzy lokalnych czynników wzrostu (BMP, TGF- $\beta$ , FGF), stymulujących dojrzewanie prekursorów osteoblastów, które wydzielają główny inhibitor osteoklastogenezы - osteoprotegerynę (OPG).

## 2. CELE PRACY

1. Ocena poziomu ekspresji genów IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10 oraz mediatorów RANKL, TNF- $\alpha$  i MMP-9 na poziomie mRNA w materiale tkankowym (kość i kieszonka retrakcyjna) uzyskanym od chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowe go z KR.

2. Ocena poziomu ekspresji genów IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10 oraz mediatorów RANKL, TNF- $\alpha$  i MMP-9 na poziomie białka, kodowanego przez badane geny w materiale tkankowym (kość i kieszonka retrakcyjna) uzyskanym od chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z KR.

3. Sprawdzenie korelacji pomiędzy poziomem mRNA a poziomem białka badanych czynników.

4. Określenie związku pomiędzy poziomem ekspresji badanych czynników a stopniem zaawansowania KR, cechami demograficznymi oraz klinicznymi.

5. Ocena związku pomiędzy głębokością niedosłuchu u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z KR a stopniem zaawansowania kieszonki.

6. Określenie rozległości i struktury zmian we fragmencie błony bębenkowej, pobranej z kieszonki retrakcyjnej.

7. Określenie charakteru zmian, które zaszły w strukturze komórek oraz wykazanie elementów włóknistych błony bębenkowej u chorych z kieszonką retrakcyjną.

Obecnie nie ma badań naukowych, które analizowałyby korelacje między poziomem ekspresji genów badanych przez nas cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych, określonych metodami immunologicznymi (PCR-RT, ELISA) a stadium zaawansowania kieszonki retrakcyjnej i obrazem w mikroskopie elektronowym (TEM). Oryginalny pozostaje również dobór cytokin, z których większość nie była analizowana ilościowo w badaniach nad patogenezą kieszonek retrakcyjnych.



### 3. MATERIAŁ I METODY

Badania zostały wykonane u 35 chorych operowanych w okresie od 1.01.2013 do 31.12.2015 r. w Klinice Otolaryngologii GUMed (kierownik prof. dr hab. med. Czesław Stankiewicz) z powodu niedosłuchu, w przebiegu przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną. Grupę kontrolną stanowił materiał tkanekowy (kość i kieszonka retrakcyjna) pobierany ze zwłok (n=25) ludzi w wieku od 18 do 45 roku życia, zmarłych śmiercią nagłą, bez chorób uszu, podczas rutynowej sekcji w Zakładzie Medycyny Sądowej GUMed (kierownik dr hab. med. Zbigniew Jankowski) bez dodatkowego oszczędzenia zwłok.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej Do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nr NKBBN/87-310/2015).

#### 3.1. Kryteria wyłączenia z badania

- dzieci do 18 r.ż. i osoby w wieku powyżej 45 lat,
- osoby od 18 do 45 r.ż. z kieszonką retrakcyjną błony bębenkowej bez wskazań do leczenia operacyjnego,
- pacjenci ze współtowarzyszącym aktywnym procesem zapalnym w innych narządach,
- pacjenci z upośledzeniem odporności (wrodzone lub nabyte choroby immunologiczne, przyjmujący leki immunosupresyjne, po przebytej chemioterapii),
- pacjenci leczeni w ciągu ostatnich 2 tygodni antybiotykami lub środkami immunomodulującymi z różnych powodów.

Zgoda na uczestnictwo w badaniu: od każdego pacjenta włączonego do badania została pobrana pisemna zgoda na uczestniczenie w omawianym projekcie po przedstawieniu tematu, celu, sposobu przeprowadzenia badania oraz o możliwych skutkach ubocznych.

Przed zabiegiem operacyjnym został zebrany wywiad dotyczący początku choroby, jej przebiegu, dolegliwości, objawów towarzyszących, narażenia na czynniki ryzyka zapalenia ucha oraz historii rodzinnej. Chorzy zostali poddani badaniu otorynolaryngologicznemu z określeniem stopnia zaawansowania kieszonki retrakcyjnej, badaniu audiologicznemu (badanie stroikami, audiometria tonalna, słowna, tympanometria) oraz badaniu obrazowemu – tomografia komputerowa wysokiej rozdzielczości kości skroniowej (TK HR).

### 3.2. Materiał badań

Materiał badawczy pobrano podczas operacji ucha od 35 chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną. Pobrana próbka tkankowa składała się ze zmienionej przez proces chorobowy części kości błębenkowej (okolica bocznej ściany nadbębienka) i fragmentu wciągniętej w tej części błony błębenkowej, wytwarzającej kieszonkę retrakcyjną. Pobierany materiał stanowi część zmienionych chorobowo tkanek, usunięcie których przewidywane jest techniką operacji tympanoplastycznych. Wszystkie zabiegi przeprowadzał ten sam operator (prof. dr hab. Jerzy Kuczkowski). Bezpośrednio po usunięciu z ucha zmian patologicznych, materiał biologiczny do badań molekularnych został umieszczony w płynie stabilizującym RNA z inhibitorami RNAz (*RNAlater Tissue Storage Reagent, Sigma-Aldrich*), a następnie przechowywany w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu następnych analiz.

Grupę kontrolną stanowił materiał tkankowy uzyskany ze zwłok (25 osób od 18 do 45 roku życia, zmarłych śmiercią nagłą, bez chorób uszu), od których zostały pobrane fragmenty kości skroniowej i fragment błony błębenkowej.

Materiał biologiczny pobierano podczas rutynowej sekcji, zgodnie z wymogami, bez dodatkowego oszpecenia zwłok. Materiał pobrano w przeciągu 24 godzin od zgonu, a ciało było przechowywane w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ . Uzyskany materiał umieszczono w buforze stabilizującym RNA i przetransportowano do Zakładu Medycyny Molekularnej GUMed gdzie przechowywano go w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu dalszych analiz.

### 3.3. Metody badań

#### 3.3.1. Badanie otorynolaryngologiczne

##### Dane epidemiologiczne

Dane zostały uzyskane od chorych podczas badania podmiotowego oraz z dokumentacji medycznej. Analizie poddano następujące czynniki: wiek, płeć oraz status społeczny (pracownik fizyczny, umysłowy, bezrobotny).

##### Objawy otologiczne

Zebrano szczegółowy wywiad od pacjentów dotyczący niedosłuchu, szumów usznych, zawrotów lub bólów głowy. Wykonano analizę czasu wystąpienia dolegliwości, ich dynamikę, czas trwania, a także stronność dolegliwości.

Oznaczono inne objawy otologiczne, nie wiążące się bezpośrednio z kieszonką retrakcyjną: wyciek z ucha, niedowład nerwu twarzowego, cechy przetoki na kanale półkolistym, niedosłuch o typie odbiorczym, epizody nagłej głuchoty w przeszłości, obecność ziarniny i /lub polipów w przewodzie słuchowym zewnętrznym oraz jamie błębenkowej.

### **Czynniki ryzyka powstania kieszonki retrakcyjnej**

Od pacjentów uzyskano dane na temat przebytego wysiękowego zapalenia ucha środkowego, poddania się zabiegowi paracentezy błony bębenkowej oraz wszczępienia drenu wentylacyjnego (pistonu) do jamy bębenkowej w przeszłości, zaburzeń czynności trąbki słuchowej, leczenia w przeszłości rozszczepu podniebienia, przewlekłego zapalenia zatok przynosowych, polipów nosa.

### **3.3.2. Metody badań radiologicznych**

U pacjentów z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego wykonano przed zabiegiem tomografię komputerową kości skroniowych wysokiej rozdzielczości (TK HR) w II Zakładzie Radiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik dr hab. med. Edyta Szurowska).

### **3.3.3. Metody badań audiologicznych**

#### **Próby stroikowe**

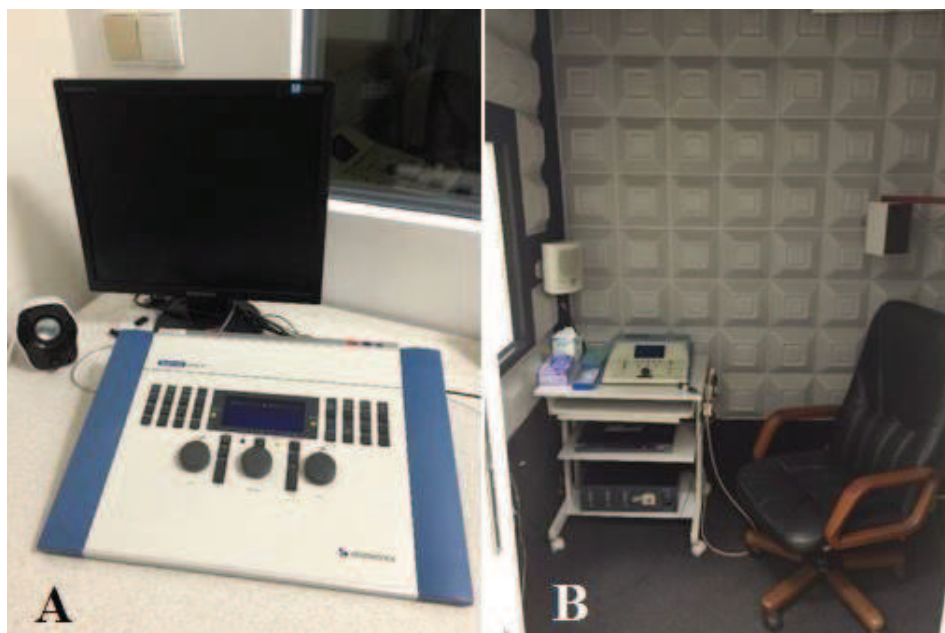
U wszystkich pacjentów grupy badawczej wykonano próby stroikowe Webera, Rinnego oraz Gellego.

Badania audiometryczne (audiometria tonalna i tympanometria) wykonano w Poradni Audiologicznej Kliniki Otolaryngologii GUMed. W trakcie badania pacjent pozostawał w pozycji siedzącej.

#### **Audiometria tonalna**

Badanie zostało przeprowadzone przy użyciu audiometru Midimate 622 firmy Madsen Electronics Ltd (ryc. 23A) w ekranowanym akustycznie pomieszczeniu (ryc. 23B). Na podstawie rejestracji progu słuchu dla przewodnictwa powietrznego została wyznaczona krzywa audiometryczna dla częstotliwości od 125 do 8000 Hz (125, 250, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 Hz). Próg słuchu dla przewodnictwa kostnego został oznaczony dla częstotliwości od 500 do 6000 Hz (500, 1000, 2000, 4000, 6000 Hz). Na podstawie uzyskanego audiogramu wyliczono średnią arytmetyczną wartości progów słyszenia, uzyskanych z krzywej przewodnictwa powietrznego oraz kostnego dla częstotliwości 500, 1000, 2000 i 4000 Hz. Na podstawie uzyskanych wartości zakwalifikowano chorych do odpowiedniej grupy zgodnie ze skalą ubytków słuchu wg Kochanka (tab. 1).

Na podstawie audiogramu obliczano rezerwę ślimakową i określano rodzaj niedosłuchu. Jeżeli rozpoznawano niedosłuch z rezerwą ślimakową nie przekraczającą 15dB, kwalifikowano to jak o niedosłuch odbiorczy. U chorych z niedosłuchem i rezerwą ślimakową powyżej 15-20 dB na 3 częstotliwościach rozpoznawano uszkodzenie słuchu o typie przewodzeniowym. Przy występowaniu w audiogramie komponentu odbiorczego jak i przewodzeniowego, niedosłuch taki zaliczano jako mieszany.



**Rycina 23.** A. Audiometr tonalny Midimate 622 firmy Madsen Electronics Ltd.

B. Kabina audiometryczna

**Figure 23.** A. The tonal audiometer Midimate 622 produced by Madsen Electronics Ltd company. B. Audiometric cabin

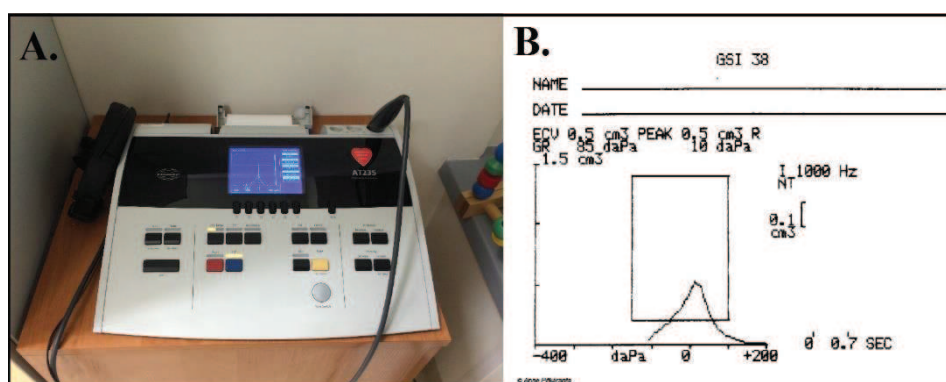
**Tabela 1.** Podział ubytku słuchu w zależności od wielkości niedosłuchu [54]

**Table 1.** Distribution of hearing loss, depending on their deepness [54]

Przedział ubytku słuchu	Skala ubytku słuchu
Poniżej 20 dB	Norma
21- 40 dB HL	Niewielki
41- 55 dB HL	Umiarkowany
56-70 dB HL	Średni
71-90 dB HL	Głęboki
Powyżej 90 dB HL	Bardzo głęboki

### Audiometria impedancyjna (tympnometria)

U wszystkich pacjentów badanie wykonywano przy pomocy zestawu Zodiak 901 firmy Madsen Electronics Ltd (ryc. 24A). Wynik badania tympnometrycznego oceniano zgodnie z klasyfikacją Jergera. Badanie odruchu mięśnia strzemiączkowego wykonano dla częstotliwości 0,5 - 1 - 2 - 4 kHz bodźcem o wartości 70-90 dB powyżej progu słuchu. Uzyskanie odpowiedzi przynajmniej w dwóch częstotliwościach uznawano za wynik prawidłowy.



**Rycina 24.** A. Audiometr impedancyjny (tympnometr) Zodiak 901 firmy Madsen Electronics Ltd. B. Wynik tympnometrii w przewlekłym zapaleniu ucha środkowego z KR

**Figure 24.** A. The impedance audiometer (tympnometer) Zodiak 901 produced by Madsen Electronics Ltd company. B. The tympanometry results in chronic otitis media with RP

### 3.3.4. Materiał i metody badań molekularnych

#### 3.3.4.1. Odczynniki użyte do badań molekularnych

Materiał i odczynniki wykorzystane celem przeprowadzenia doświadczeń charakteryzowały się czystością analityczną.

W tabeli 2 przedstawiono użyte odczynniki i ich producentów (PCR-RT).

W tabeli 3 przedstawiono użyte odczynniki i ich producentów (ELISA).

**Tabela 2.** Informacja dotycząca odczynników, wykorzystanych w badaniu PCR-RT  
**Table 2.** Information about the reagents used in the RT-PCR study

<b>Producent</b>	<b>Odczynnik</b>
Applied Biosystems	Path- ID™ Multiplex One- step RT-PCR KIT
Oligo.pl	Primery użyte w reakcjach PCR specyficzne dla transkryptów genów: IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , MMP-9, RANKL
POCH	Izopronanol, Metanol Etanol
Roche	Sondy typu Taq Man Uniwersal Probe Library Probe (# 6, 7, 17, 29, 45) Universal ProbeLibrary Reference Gene Assays: Human ACTB Gene Assay, Human TBP Gene Assay LightCycler płytki 96 dołkowe
SIGMA- ALDRICH	Chloroform TRI Reagent RNAlater Tissue Storage Reagent

**Tabela 3.** Informacja dotycząca odczynników, wykorzystanych w badaniu ELISA  
**Table 3.** Information about the reagents used in the ELISA study

<b>Producent</b>	<b>Odczynnik</b>
Invitrogen	Human TNF alpha ELISA kit Human IL-6 ELISA kit Human IL-10 ELISA kit
ABnova	MMP-9 (human) ELISA kit
MyBioSource	Human IL-1 alfa ELISA kit
MyBioSource	Human RANKL ELISA kit

### 3.3.4.2. Metody badań molekularnych

#### **Izolacja całkowitego RNA z tkanek (Zakład Medycyny Molekularnej GUMed)**

Całkowity RNA izolowano z badanych tkanek według metody Chomczyńskiego i Sacchiciz zastosowaniem własnych modyfikacji. Fragmenty kości i tkanki kieszonki retrakcyjnej umieszczono w 1ml TRI- Reagentu (Sigma) i homogenizowano przy użyciu homogenizatora nożykowego. Następnie próbki inkubowano przez 15 minut. Kolejno dodawano 250 µl chloroformu i po intensywnym wstrząsaniu próbki inkubowano przez 15 min w lodzie. Uzyskaną mieszaninę wirowano przez 15 minut w temperaturze 4°C przy 10000 x g. Po odwirowaniu do supernatantu dodawano równoważną objętość i zopropanolu i próbkę inkubowano co najmniej 18 godzin w temperaturze -20°C. Uzyskany osad, po odwirowaniu przez 15 minut w 4°C przy 10000 x g, przemywano schłodzonym 96%, a następnie 70% etanolem. Po osuszeniu osad rozpuszczono w 30 µl jałowej wody destylowanej, wolnej od RNAz. Stężenie wyizolowanego całkowitego RNA oznaczono fluorymetrycznie, a czystość – za pomocą elektroforezy agarozowej.

Wyizolowaną całkowitą RNA były przechowywano w temp. – 20 °C do czasu przeprowadzenia dalszych analiz.

#### **Pomiar stężenia wyizolowanego całkowitego RNA**

Stężenie uzyskanego RNA oznaczono fluorymetrycznie przy użyciu zestawu Quant-iT™ zgodnie z protokołem producenta w fluorymetrze Qubit firmy Invitrogen.

#### **Reakcja RT - PCR w czasie rzeczywistym (Real Time PCR)**

W celu oceny poziomu ekspresji wybranych cytokin i mediatorów na poziomie mRNA dla badanych genów oznaczono w odniesieniu do poziomu transkryptu genu referencyjnego (beta-aktyny, TBP (ang. *TATA - box binding protein*) podczas reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem sond typu TagMan. Reakcję RT-PCR prowadzono z wykorzystaniem zestawu Path-IDTM Multiplex One-Step RT-PCR kit i sond Universal ProbeLibraryProbe for Human (Roche) w aparacie LightCycler 480 II firmy Roche. Względny poziom ekspresji genu badanego przedstawiono jako znormalizowany stosunek poziomu ekspresji genu analizowanego do genu referencyjnego.

W tabeli 4 przedstawiono sekwencję starterów i numery sond wykorzystanych celem przeprowadzenia reakcji PCR. W tabeli 5 przedstawiono warunki przeprowadzenia poszczególnych etapów reakcji PCR-RT.

**Tabela 4.** Startery i sondy wykorzystane w reakcjach PCR  
**Table 4.** The primers and probes used in the PCR reactions

Transkrypt badanego genu	Nazwa	Sekwencja	Gen referencyjny
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	Sonda	Uniwersal Probe Library Probe #6	<b>TBP</b>
	5' starter	5' -ggttgagtttaagccaatcca-3'	
	3' starter	3' -tgctgacctaggcttgatga-5'	
<b>IL-6</b>	Sonda	Uniwersal Probe Library Probe # 7	<b>ACTB</b>
	5' starter	5' -caggagcccagctatgaact-3'	
	3' starter	3' -agcaggcaacaccaggag-5'	
<b>IL-10</b>	Sonda	Uniwersal Probe Library Probe # 45	<b>TBP</b>
	5' starter	5' -cataaattagaggctcctcaaaatcg-3'	
	3' starter	3' -aaggggctgggtcagctat-5'	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Sonda	Uniwersal ProbeLibrary Probe # 29	<b>ACTB</b>
	5' starter	5' -cagcctcttctccttctgat-3'	
	3' starter	3' -gccagagggtgattagaga-5'	
<b>MMP-9</b>	Sonda	Uniwersal ProbeLibrary Probe # 6	<b>TBP</b>
	5' starter	5' -gaaccaatctcaccgacagg-3'	
	3' starter	3' -gccacccgagtgttaaccata-5'	
<b>RANKL</b>	Sonda	Uniwersal ProbeLibrary Probe # 17	<b>TBP</b>
	5' starter	5' -tgattcatgtaggagaataaacagg-3'	
	3' starter	3' -gatgtgctgtgatcaacga-5'	



**Tabela 5.** Warunki przeprowadzenia reakcji PCR-RT**Table 5.** Conditions for conducting the PCR-RT

	<b>Etap</b>	<b>Ilość cykli</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Czas</b>
<b>Odwrotna transkrypcja</b>	1	1	48°C	10 min
<b>Denaturacja</b>	2	1	95°C	10 min
<b>Amplifikacja</b>	3	45	95°C 60°C	15 sek 45 sek

### Test ELISA

Stężenie białka dla cytokin (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10), MMP-9, RANKL oraz TNF- $\alpha$  w homogenacie tkankowym oznaczono metodą ELISA za pomocą komercyjnych zestawów. Fragmenty tkanki o wadze 10 mg (mokra tkanka) homogenizowano w 0,5 ml roztworu PBS 0,5% z niejonowym detergentem Igepol CA-630 i zamrożono na noc w temperaturze -20°C. Następnie po dwukrotnym cyklu rozmrożenia i zamrożenia homogenat wirowano przez 5 min przy 5000x g w temp. 4°C. Supernatant zbierano natychmiast i przechowywano do oznaczenia w -20°C. Stężenia badanych białek oznaczono na podstawie krzywych wzorcowych. Stężenie białka wyrażano w pg/ml lub  $\mu$ g/ml (dla MMP-9), zakładając, że na 1 ml supernatantu przypada 20 mg mokrej tkanki.

### 3.3.5. Transmisyjna mikroskopia elektronowa

Materiał biologiczny (fragmenty błony bębenkowej z kieszonki retrakcyjnej) pobrane od pacjenta w Klinice Otolaryngologii GUMed podczas planowej operacji ucha z powodu przewlekłego zapalenia ucha środkowego z KR po przepłukaniu w PBS i pocięciu na elementy wielkości około 1 mm<sup>3</sup> był umieszczany w roztworze utrwalającym o składzie: 2,5% aldehyd glutarowy w 0,1% buforze kakodylanowym, pH 7,4 z dodatkiem sacharozy. Proces utrwalania przebiegał całą noc w temp. 4°C. Fragmenty tkanek następnie dobarwiano przez 2 godziny w 2% roztworze czterotlenku osmu (OsO<sub>4</sub> tym samym buforze) a następnie 3x płukano w buforze kakodylanowym. Odwadnianie tak utrwalonego materiału odbywało się w serii roztworów etanolu o wzrastającym stężeniu (30%, 50%, 75%, 90% 2x oraz ETOH absolutnego). Materiał był dodatkowo „prześwietlany” w tlenku propylenu.

Fragmenty tkanki poddawane były kilkustopniowej procedurze przepajania żywicą epoksydową (Epon 812, Merck) i poddawane polimeryzacji w temp. 37°C.

Skrawki półciemki (1,5  $\mu$ m) były wykonane przy użyciu ultramikrotomu (Om U2, Reichert), następnie barwione błękitem toluidyny i oceniane w mikroskopie świetlnym.

Skrawki ultracienkie o grubości 60 – 80 nm wykonano przy użyciu noża diamentowego, zbierane na siatki miedziane pokryte Formvarem, następnie kontrastowane octanem uranylu i cytrynianem ołowiu.

Ocena materiału i dokumentacja fotograficzna była dokonywana w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (JEM 1200EX II, Jeol, Japonia) (ryc. 25), a stosowane napięcie wynosiło 80 kV.



**Rycina 25.** Transmisyjny mikroskop elektronowy (JEM1200EXII, Jeol, Japonia)  
**Figure 25.** Transmission electron microscope (JEM 1200 EX II, Jeol, Japan)

### 3.3.6. Metody analizy statystycznej

Analiza statystyczna uzyskanych wyników badań była przeprowadzona za pomocą programu Statistica v.12,0 (StatSoft Polska). Zastosowano statystyki opisowe takie jak średnią arytmetyczną i medianę (M) jako miarę wartości najlepiej reprezentującą wszystkie wartości zmiennej oraz odchylenie standardowe i kwantyle jako miarę zróżnicowania wyników. Dane prezentowano także w postaci zestawień procentowych oraz tabel informujących o rozkładzie liczebności obiektów w grupach. Normalność rozkładów badano testem W Shapiro-Wilka.

W procesie analizy statystycznej przyjęto, że o wyniku znamionym statystycznie można mówić, gdy uzyskany poziom istotności (p) był mniejszy od granicznego poziomu istotności  $\alpha = 0,05$ .

Poziom ekspresji badanych genów w dwóch grupach: kontrolnej i badanej, został poddany analizie nieparametrycznej testem U Manna-Whitneya. Natomiast korelacje między poziomem ekspresji badanych genów a cechami kliniczno-patologicznymi badanych tkanek i objawami klinicznymi u pacjentów (co najmniej jedna ze zmiennych wyrażona była na poziomie porządkowym) były analizowane za pomocą współczynnika korelacji rangowej R Spearmana. Założono, że wartość R wynosząca około 0,20 (i -0,20) oznacza niską korelację, 0,60 (-0,60) średnią korelację około 0,80 (-0,80) wysoką korelację badanych cech i zmiennych. Poziom ekspresji badanych genów w trzech grupach o różnych stopniach zaawansowania kieszonki retrakcyjnej został poddany analizie nieparametrycznym testem Kruskala-Wallisa.

## 4. WYNIKI

### 4.1 Analiza cech epidemiologiczno-klinicznych

Badanie wykonano w grupie 35 pacjentów z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną, operowanych w Klinice Otolaryngologii GU-Med w okresie od 1.01.2013 do 31.12.2015 r. z powodu niedosłuchu. Pobrana próbka składała się ze zmienionej przez proces chorobowy części kości PSZ (okolica scutum) i fragmentu wciągniętej błony bębenkowej i tkanki kostnej bocznej ściany nadbębenka, wytwarzającej kieszonkę retrakcyjną. Wszystkie zabiegi przeprowadził ten sam operator (prof. dr hab. med. Jerzy Kuczkowski). Grupę kontrolną stanowiły fragmenty błony bębenkowej i tkanki kostnej ze scutum, pobierane ze zwłok (n=25) ludzi w wieku 18-45 lat, zmarłych śmiercią nagłą, bez chorób uszu, w czasie rutynowej sekcji w Zakładzie Medycyny Sądowej GUMed.

Grupa badana składała się z 7 (20%) mężczyzn oraz 28 (80%) kobiet. Stosunek pacjentów wg płci (M:K) wyniósł 1:4.

Wiek pacjentów, zgodnie z kryteriami wykluczającymi z badania wahał się od 18 do 45 lat. Mediana wieku w grupie badanej wyniosła 36,67 lat (mężczyźni – 39,71 lat; kobiety – 35,88 lat). W obu w/wym. grupach minimalny i maksymalny wiek odpowiadał przyjętym granicom wiekowym, czyli 18 i 45 lat. Podział wiekowy w grupie kobiet różnił się nieznacznie od wieku w grupie mężczyzn. W badanej grupie zaobserwowano przewagę pacjentów w III dekadzie życia. Wykazano dodatnią, znamienne statystycznie korelację między wiekiem pacjentów a typem i poziomem niedosłuchu (tab. 6). U pacjentów w III i IV dekadzie życia najczęściej rozpoznawano niedosłuch przewodzeniowy z umiarkowanym lub średnim stopniem niedosłuchu. Nie wykazano natomiast statystycznie istotnego związku między wiekiem pacjentów a płcią, typem kieszonki retrakcyjnej oraz stopniem jej zaawansowania (tab. 6).

Zmiany chorobowe dotyczyły tylko jednego ucha pacjenta w 35 przypadkach (100%), wśród których zmiany patologiczne stwierdzono w uchu prawym u 22 pacjentów (62,86%), w uchu lewym u 13 (37,14%).

Wśród objawów otologicznych u chorych odnotowano: szумы uszne u 6 (17,14%); wyciek z ucha u 11 (31,43%); okresowe zawroty głowy u 6 (17,14%) pacjentów. Wykazano dodatni, istotny statystycznie związek między obecnością szumów usznych a typem niedosłuchu oraz stopniem niedosłuchu (tab. 7). Najczęściej szумы uszne występowały u pacjentów z niedosłuchem mieszanym umiarkowanego i średniego stopnia. Nie wykazano natomiast statystycznie istotnego związku między szumem usznym a wiekiem pacjentów, płcią, typem KR oraz stopniem jej zaawansowania. Wyciek z ucha najczęściej obserwowano u chorych z KR w późnym stadium zaawansowania (III i IV stadium), co potwierdza dodatnia, znamienne statystycznie korelacja między obecnością wycieków z ucha a stadium zaawansowania (tab. 7).

Wykazano dodatnią, znamienne statystycznie korelację między obecnością incydentów zawrotów głowy oraz wiekiem, typem i poziomem niedosłuchu (tab. 7). Napady zawrotów głowy stwierdzono u pacjentów w III i IV dekadzie życia,

u których rozpoznano niedosłuch mieszany z umiarkowanym i średnim stopniem niedosłuchu. W badaniach laboratoryjnych podwyższoną leukocytozę stwierdzono u 1 (2,86%) pacjenta, a podwyższenia wskaźników OB, CRP nie stwierdzono w badanej populacji. Czas od stwierdzenia pierwszych objawów choroby (najczęściej niedosłuchu) do leczenia operacyjnego wynosił  $M=5,4$  lat. Okres trwania choroby nie różnił się w istotny sposób pomiędzy grupą badanych kobiet a mężczyzn (kobiety - 4,9 lat; mężczyźni - 5,6 lat).

**Tabela 6.** Korelacja zmiennych danych demograficznych oraz cech klinicznych pacjentów z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną ( $n=35$ ),  $p<0,05$

**Table 6.** The variables correlation of demographic and clinical features of patients with chronic otitis media with retraction pocket ( $n = 35$ ),  $p < 0.05$

	Płeć	Typ niedosłuchu	Poziom niedosłuchu	Typ KR	Stadium zaawansowania
Wiek	-0,1785	0,3898	0,4156	-0,0594	-0,1226
Płeć	-	0,2509	0,2242	0,0094	-0,0321
Typ niedosłuchu		-	0,7992	0,0234	-0,0401
Poziom niedosłuchu			-	0,1658	0,0109
Typ KR				-	-0,1565

W tabeli przedstawiono wartość współczynnika korelacji rangowej R Spearmana.  
Kolorem żółtym oznaczono wyniki z wysokim współczynnikiem R Spearmana.

**Tabela 7.** Korelacja między cechami klinicznymi pacjentów z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną ( $n=35$ ),  $p<0,05$

**Table 7.** The correlation between the clinical features of patients with chronic otitis media with retraction pocket ( $n = 35$ ),  $p < 0.05$

	Wiek	Płeć	Typ niedosłuchu	Poziom niedosłuchu	Typ KR	Stadium zaawansowania
Perforacja BB	0,0189	-0,0805	0,1787	0,0885	-0,2066	0,4341
Szum uszny	0,3629	0,0449	0,5883	0,5867	-0,1294	0,034
Wyciek z ucha	-0,0032	0,0411	0,2321	0,0678	-0,1704	0,3741
Ziarnina	-0,1613	0,006	-0,1558	-0,2646	-0,268	0,4546
Zawroty głowy	0,3396	0,0061	0,5277	0,4608	0,0965	0,0732

W tabeli przedstawiono wartość współczynnika korelacji rangowej R Spearmana.  
Kolorem żółtym oznaczono wyniki z wysokim współczynnikiem R Spearmana.

#### 4.2 Analiza danych otologicznych

W badaniu mikrootoskopowym wykazano KR w części wiotkiej błony bębenkowej u 10 (28,57%) chorych, w części napiętej u 25 (71,43%).

Perforację błony bębenkowej w jej części wiotkiej stwierdzono u 1 (2,86%) pacjenta, w części napiętej KR u 5 (14,28%). Wykazano dodatnią, znamioną statystycznie korelację między obecnością perforacji błony bębenkowej a stadium zaawansowania kieszonki retrakcyjnej (tab. 7). Zaobserwowano, że perforacja błony bębenkowej występuje w zaawansowanym stadium rozwoju KR (III i IV stadium).

Obecność tkanki ziarninowej w PSZ stwierdzono u 5 (14,28%) chorych. Wykazano dodatnią zależność między obecnością ziarniny w przewodzie słuchowym zewnętrznym i/lub jamy bębenkowej od stadium zaawansowania kieszonki retrakcyjnej (tab. 7). Jak i w przypadku perforacji błony bębenkowej, obecność ziarniny zaobserwowano w zaawansowanym stadium rozwoju kieszonki retrakcyjnej.

#### 4.3. Stopień zaawansowania kieszonki retrakcyjnej

Kieszonkę retrakcyjną w części wiotkiej (wg klasyfikacji Tosa): II stopnia stwierdzono u 1 (2,86%) pacjenta, III stopnia u 7 (20%), IV stopnia u 2 (5,71%).

Kieszonkę retrakcyjną w części napiętej błony bębenkowej (wg klasyfikacji Sade): II stopnia stwierdzono u 5 (14,28%) pacjentów, III stopnia – u 7 (20%), IV stopnia – u 13 (37,14%). Nie obserwowano pacjentów z kieszonką retrakcyjną w I stadium rozwoju, co może wynikać z braku dolegliwości ze strony ucha.

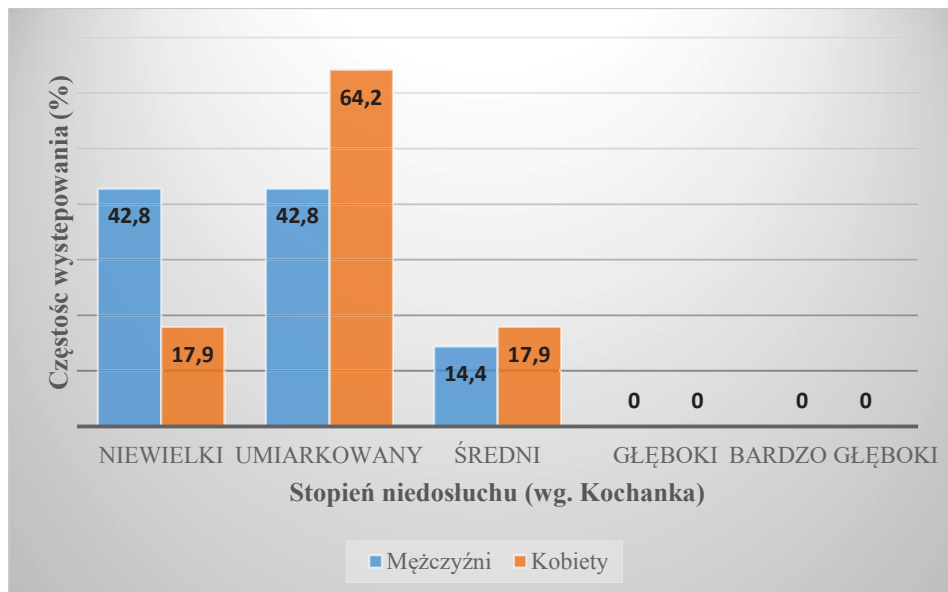
Wykazano dodatnią, znamioną statystycznie korelację między stadium zaawansowania kieszonki retrakcyjnej w części napiętej i części wiotkiej błony bębenkowej a obecnością takich objawów klinicznych jak: perforacja błony bębenkowej, wyciek z ucha, obecność tkanki ziarninowej. Nie wykazano natomiast statystycznie istotnego związku między stadium zaawansowania KR a występowaniem u pacjentów szumów usznych czy zawrotów głowy. Nie stwierdzono również związku z wiekiem pacjentów, płcią, typem niedosłuchu, poziomem niedosłuchu oraz typem kieszonki retrakcyjnej (tab. 6, 7).

#### 4.4 Analiza danych audiologicznych

Analizując wyniki badań audiometrycznych okazało się, że niedosłuch przewodzeniowy miało 22 pacjentów (62,8%), niedosłuch mieszany – 13 (37,2%). Średni poziom niedosłuchu w grupie pacjentów z niedosłuchem przewodzeniowym wynosił 40 dB, w grupie pacjentów z niedosłuchem mieszanym – 59 dB; średni poziom niedosłuchu w całej grupie badanej wynosił – 47 dB. Większość mężczyzn w grupie badanej miało niedosłuch niewielkiego (42,8% mężczyzn) i umiarkowanego stopnia (42,8% mężczyzn) (ryc. 26). Istotnie statystycznie więcej kobiet niż mężczyzn miało niedosłuch umiarkowany (64,2% kobiet) (ryc. 26).

Średnia rezerwy ślimakowej dla ucha z kieszonką retrakcyjną mieściła się w przedziale od 20 dB do 45 dB, a średnia rezerwa ślimakowa dla całej grupy - 21,3 dB przed operacją.

Wykonano analizę danych audiologicznych: głębokość niedosłuchu, typ niedosłuchu a zmiennymi demograficznymi i cechami klinicznymi przewlekłego zapalenia ucha środkowego (wiek, płeć, typ kieszonki retrakcyjnej oraz stopień jej zaawansowania, występowanie wycieków z ucha, szumów usznych, zawrotów głowy, obecność perforacji błony bębenkowej i tkanki ziarninowej w obrębie ucha zewnętrznego i środkowego. Wykazano pozytywny, statystycznie istotny związek między typem niedosłuchu a wiekiem pacjenta, poziomem niedosłuchu, obecnością szumów usznych oraz występowaniem zawrotów głowy (tab. 6, 7). Wykazano dodatnią, statystycznie istotną korelację między poziomem niedosłuchu a wiekiem pacjentów, typem niedosłuchu, występowaniem szumów usznych oraz zawrotów głowy. Okazało się, że im starszy pacjent tym głębszy był poziom niedosłuch oraz głębsza wartość komponentu odbiorczego niedosłuchu w przypadku niedosłuchu mieszanego. Większy poziom niedosłuchu obserwowano u pacjentów z cechami czynnego stanu zapalnego w wywiadzie: ziarnina w obrębie ucha, wyciek z ucha i zawroty głowy. Rozpatrując pozostałe cechy nie wykazano zależności statystycznych.



**Rycina 26.** Częstość występowania (%) w zależności od płci różnych stopni niedosłuchu u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną

**Figure 26.** The incidence of (%) depending on the sex of different degrees of hearing loss in patients with chronic otitis media with retraction pocket

#### 4.5 Analiza wyników badań molekularnych

W grupie badanej (n=35) i grupie kontrolnej (n=25) określono poziom ekspresji genu *IL-1 $\alpha$* , *IL-6*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$* , *MMP-9* oraz *TNFSF11* na poziomie mRNA za pomocą metody RT-PCR w czasie rzeczywistym. Wyniki przedstawiono jako względny poziom ekspresji badanego genu w stosunku do poziomu ekspresji genu referencyjnego (tab. 8).

Za pomocą testów ELISA określono stężenie IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , MMP-9 oraz RANKL w materiale biologicznym pobranym od chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z KR oraz w grupie kontrolnej (tab. 9).

Uzyskane wyniki pokazują istotny wzrost poziomu ekspresji badanych genów zarówno na poziomie mRNA jak i na poziomie białka w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną.

**Tabela 8.** Poziom ekspresji genów *IL-1 $\alpha$* , *IL-6*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$* , *MMP-9* i *TNFSF11* u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego i kieszonką retrakcyjną  
**Table 8.** The genes expression level of *IL-1 $\alpha$* , *IL-6*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$* , *MMP-9* and *TNFSF11* in patients with chronic otitis media and retraction pocket

	<i>IL-1<math>\alpha</math></i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-10</i>	<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	<i>MMP-9</i>	<i>TNFSF11</i>
<b>Grupa badana (M)</b>	0,00993 *	0,00272 *	0,0206*	0,022*	5,105*	0,665*
<b>Grupa kontrolna (M)</b>	0,00048	0,00025	0,00008	0,0001 4	2,115	0,000245

M = mediana; \* - p<0,05

**Tabela 9.** Stężenie IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , MMP-9 i RANKL u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego i kieszonką retrakcyjną  
**Table 9.** Concentration of *IL-1 $\alpha$* , *IL-6*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$* , *MMP-9* and *RANKL* in patients with chronic otitis media and retraction pocket

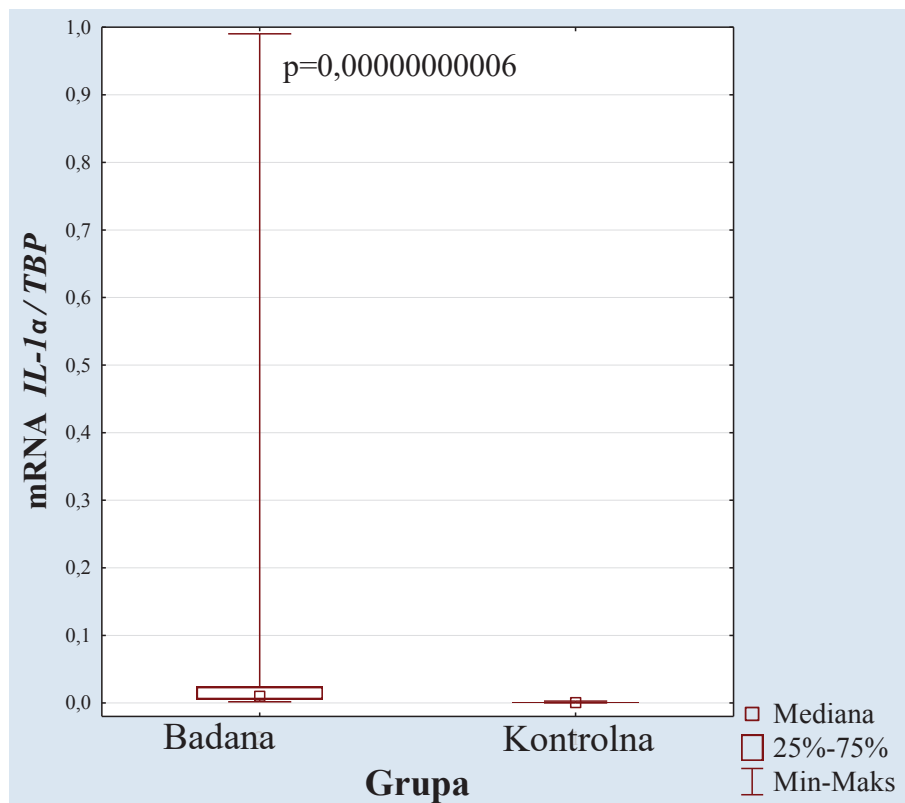
	<b>IL-1<math>\alpha</math></b> (pg/ml)	<b>IL-6</b> (pg/ml)	<b>IL-10</b> (pg/ml)	<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (pg/ml)	<b>MMP-9</b> ( $\mu$ g/ml)	<b>RANKL</b> (pg/ml)
<b>Grupa badana (M)</b>	15*	13,215*	29,3*	16,75*	5,23*	40*
<b>Grupa kontrolna (M)</b>	2	0,66	1,75	0,95	0,13	4

M = mediana; \* - p<0,05

#### 4.5.1 Ocena poziomu ekspresji genu dla $IL-1\alpha$ u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną

U chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną dochodzi do znacznego wzrostu poziomu mRNA dla genu  $IL-1\alpha$  ( $\times 20,69$ ). Wartość środkowa ( $M$ ) w grupie badanej wynosi 0,00993 a w grupie kontrolnej  $M=0,00048$ ;  $p=0,00000000006$  (ryc. 27 A).

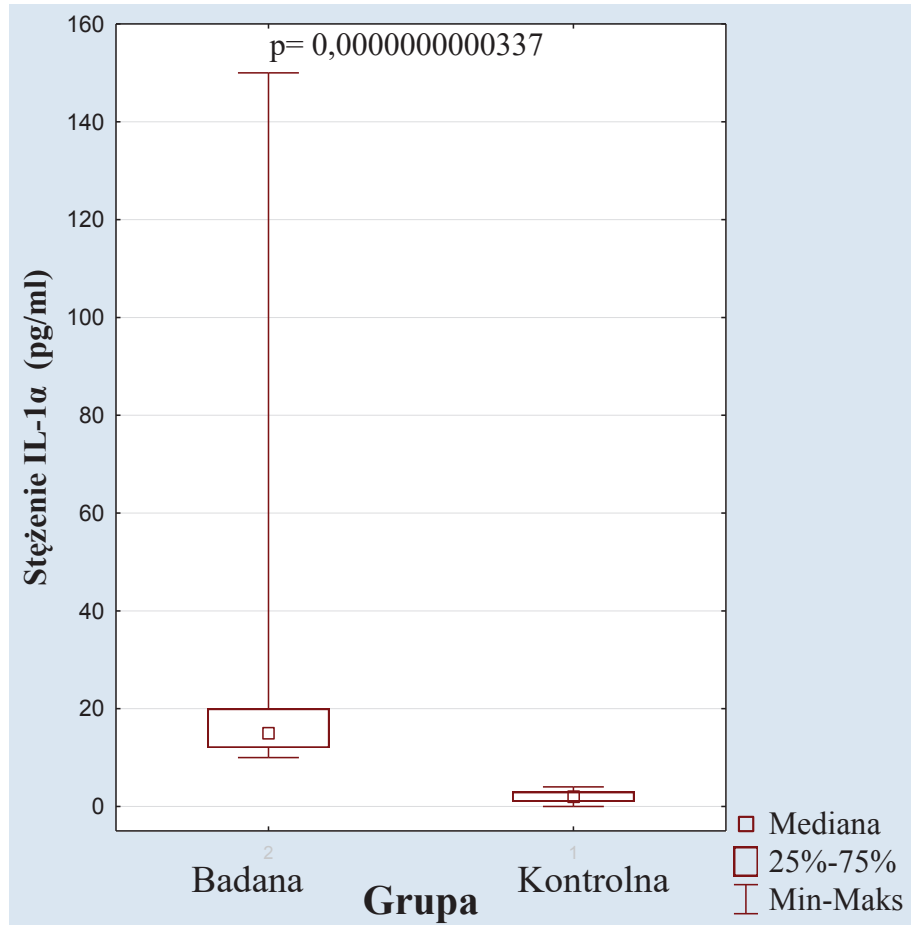
W wykonanym teście ELISA określono stężenie  $IL-1\alpha$  (ryc. 27 B). W grupie badanej ( $n=35$ ) stężenie  $IL-1\alpha$  wynosiło  $M= 15\text{pg/ml}$  i było znacznie wyższe ( $\times 7,5$ ) niż w materiale biologicznym pobranym ze zwłok, w którym wynosiło  $M= 2\text{pg/ml}$ ,  $p=0,0000000000337$ .



**Rycina 27 A.** Ekspresja genu  $IL-1\alpha$  w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną na poziomie mRNA

**Figure 27 A.** Expression of  $IL-1\alpha$  gene in biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket on the mRNA level



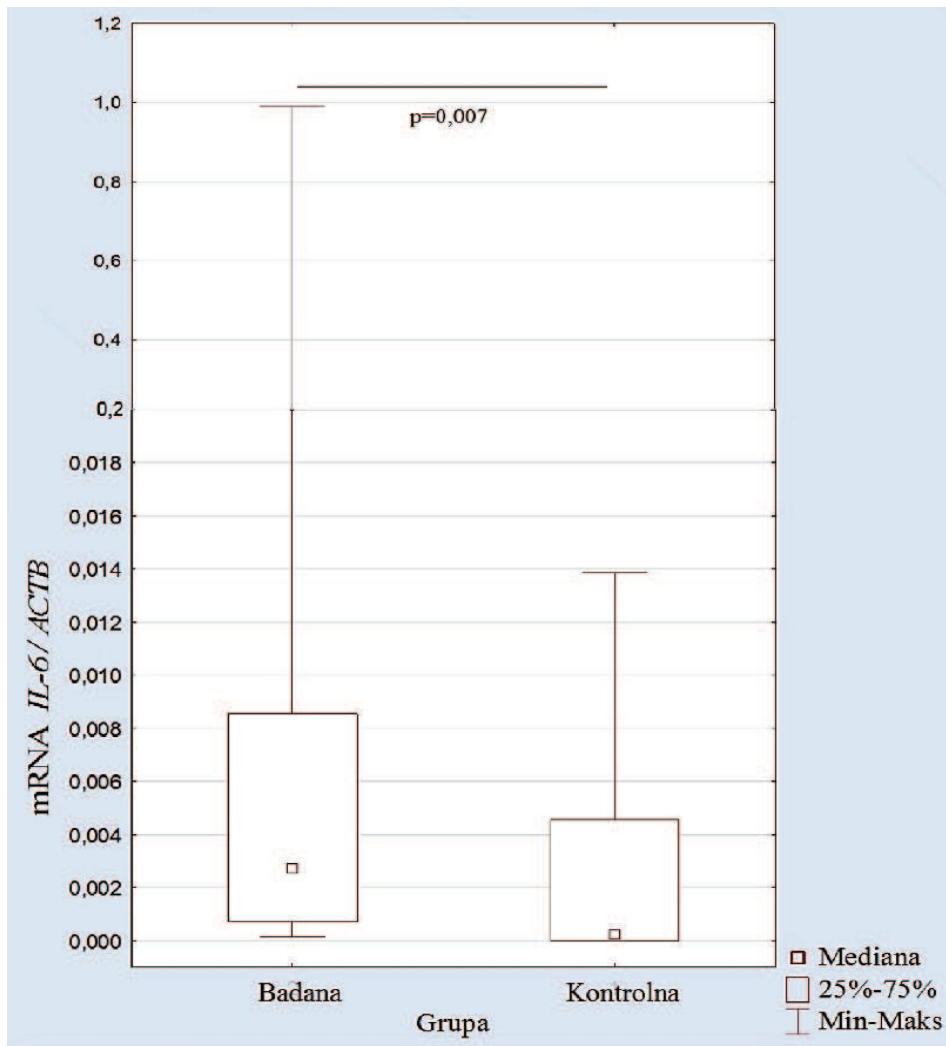


**Rycina 27 B.** Ekspresja genu *IL-1α* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną na poziomie białka  
**Figure 27 B.** Expression of *IL-1α* gene in biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket on the protein level

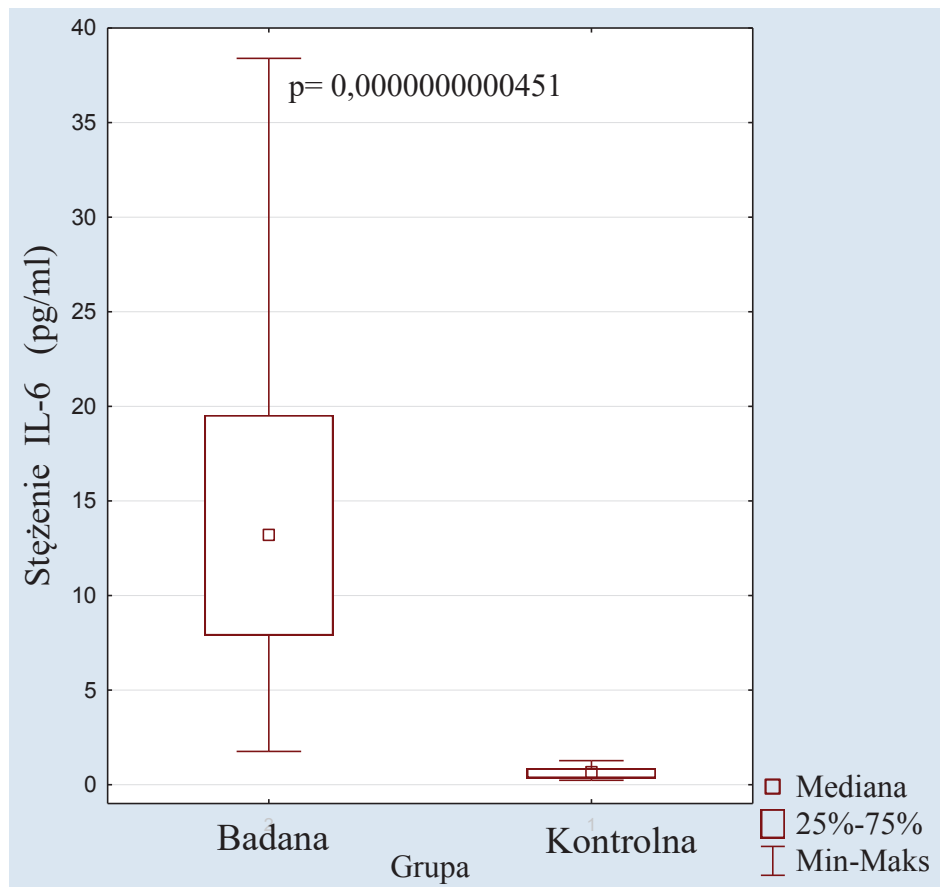
#### 4.5.2 Ocena poziomu ekspresji genu dla *IL-6* u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną

W grupie badanej (n=35) poziom ekspresji genu *IL-6* w stosunku do genu referencyjnego  $\beta$ -aktyny (ACTB), określony za pomocą metody RT-PCR w czasie rzeczywistym (tab. 4), wartość średnia wynosiła 0,00272 i była znacznie wyższa (x10,88) niż w materiale biologicznym pobranym ze zwłok (n=25), gdzie  $M=0,00025$ ,  $p=0,007$  (ryc. 28 A).

Za pomocą testu ELISA określono stężenie IL-6 (ryc. 28 B). W grupie badanej (n=35) stężenie IL-6 wynosiło  $M=13,215$  pg/ml i było znacznie wyższe ( $\times 20,02$ ) niż w materiale biologicznym pobranym ze zwłok (n=25), w którym stężenie białka wynosiło  $M=0,66$  pg/ml,  $p=0,0000000000451$ .



**Rycina 28 A.** Ekspresja genu *IL-6* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną na poziomie mRNA  
**Figure 28 A.** Expression of *IL-6* gene in biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket on the mRNA level

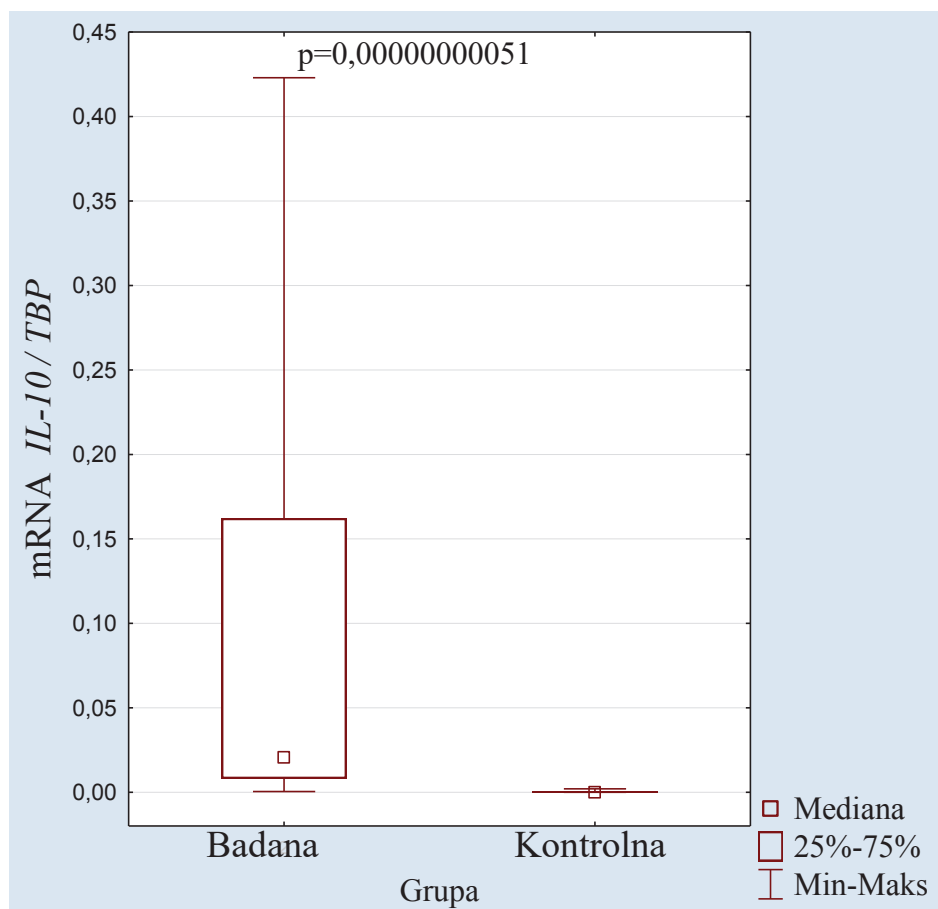


**Rycina 28 B.** Ekspresja genu *IL-6* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną na poziomie białka  
**Figure 28 B.** Expression of *IL-6* gene in biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket on the protein level

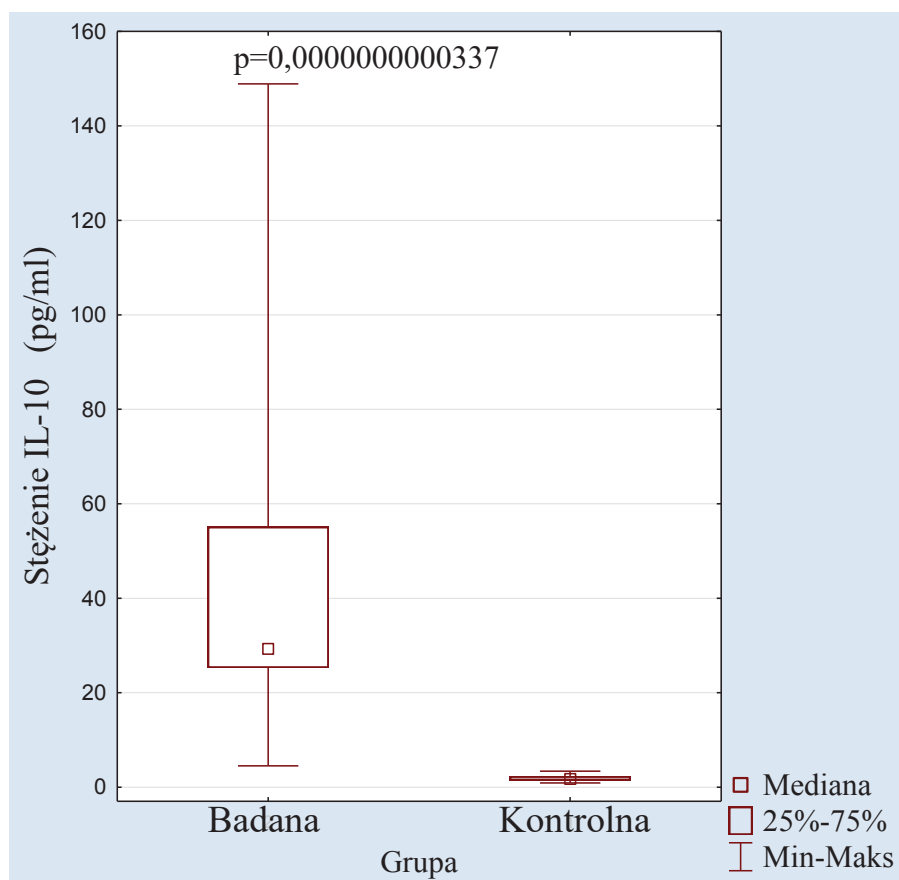
#### 4.5.3 Ocena poziomu ekspresji genu dla *IL-10* u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną

U chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną dochodzi do znacznego wzrostu poziomu mRNA dla genu *IL-10* (x2575). Wartość środkowa (*M*) w grupie badanej wynosi 0,0206 a w grupie kontrolnej  $M=0,00008$ ;  $p=0,00000000051$  (ryc. 29 A).

Wykonano test ELISA, w którym określono stężenie *IL-10* (ryc. 29 B). W grupie badanej ( $n=35$ ) stężenie *IL-10* wynosiło  $M= 29,3\text{pg/ml}$  i było znacznie wyższe (x16,74) niż w materiale biologicznym pobranym ze zwłok, w którym wynosiło  $M= 1,75\text{pg/ml}$ ,  $p=0,000000000337$ .



**Rycina 29 A.** Ekspresja genu *IL-10* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną na poziomie mRNA  
**Figure 29 A.** Expression of *IL-10* gene in biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket on the mRNA level

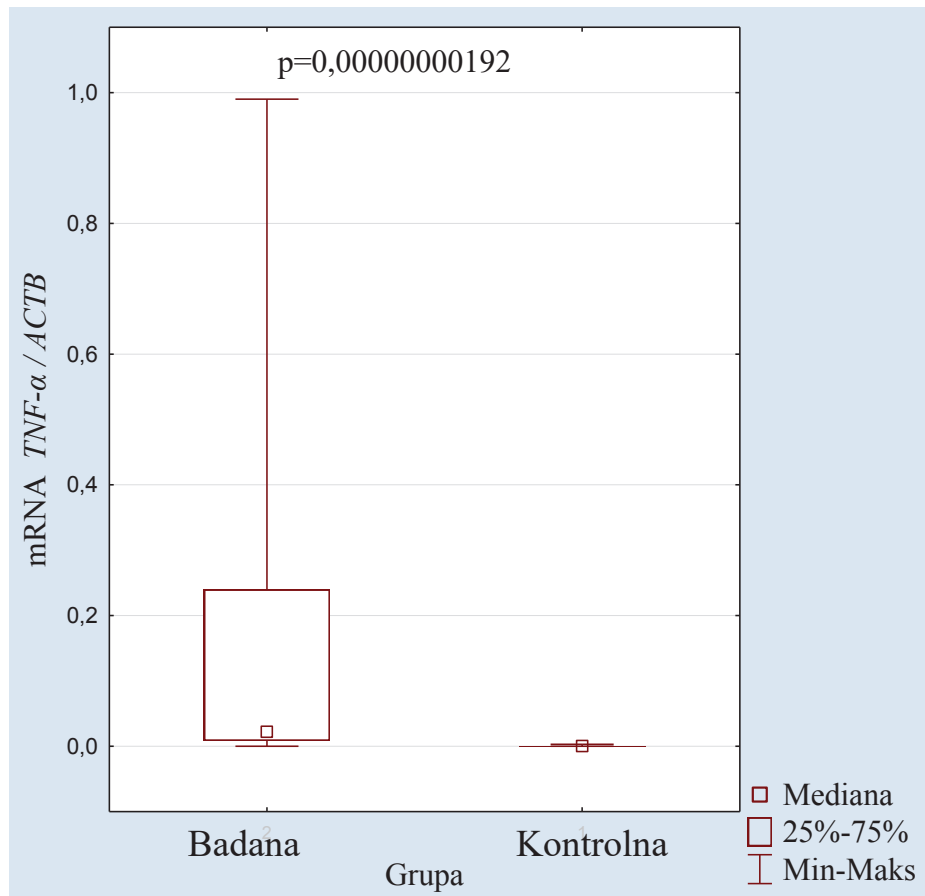


**Rycina 29 B.** Ekspresja genu *IL-10* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną na poziomie białka  
**Figure 29 B.** Expression of *IL-10* gene in biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket on the protein level

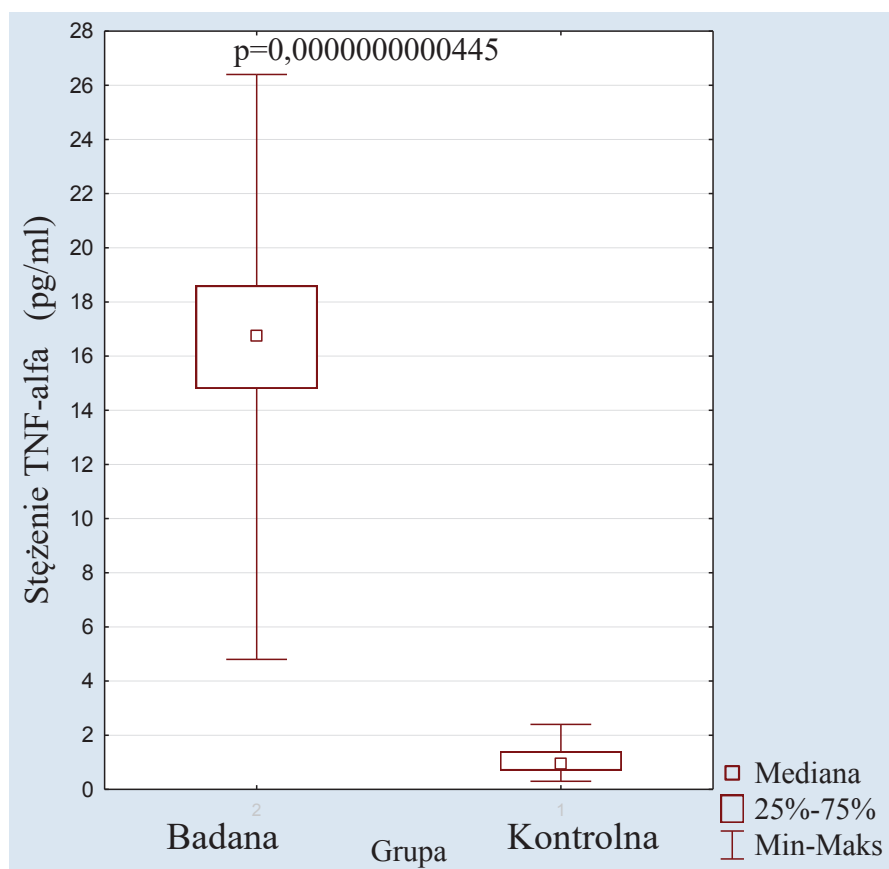
#### 4.5.4 Ocena poziomu ekspresji genu dla $TNF-\alpha$ u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną

U chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną dochodzi do znacznego wzrostu poziomu mRNA dla genu *TNF- $\alpha$*  (x157,14). Wartość środkowa ( $M$ ) w grupie badanej wynosi 0,022 a w grupie kontrolnej  $M=0,00014$ ;  $p=0,00000000192$  (ryc. 30 A).

Wykonano test ELISA, w którym określono stężenie  $TNF-\alpha$  (ryc. 30 B). W grupie badanej ( $n=35$ ) stężenie  $TNF-\alpha$  wynosiło  $M= 16,75\text{pg/ml}$  i było znacznie wyższe (x17,6) niż w materiale biologicznym pobranym ze zwłok, w którym wynosiło  $M= 0,95\text{pg/ml}$ ,  $p=0,000000000445$ .



**Rycina 30 A.** Ekspresja genu *TNF-α* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną na poziomie mRNA  
**Figure 30 A.** Expression of *TNF-α* gene in biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket on the mRNA level

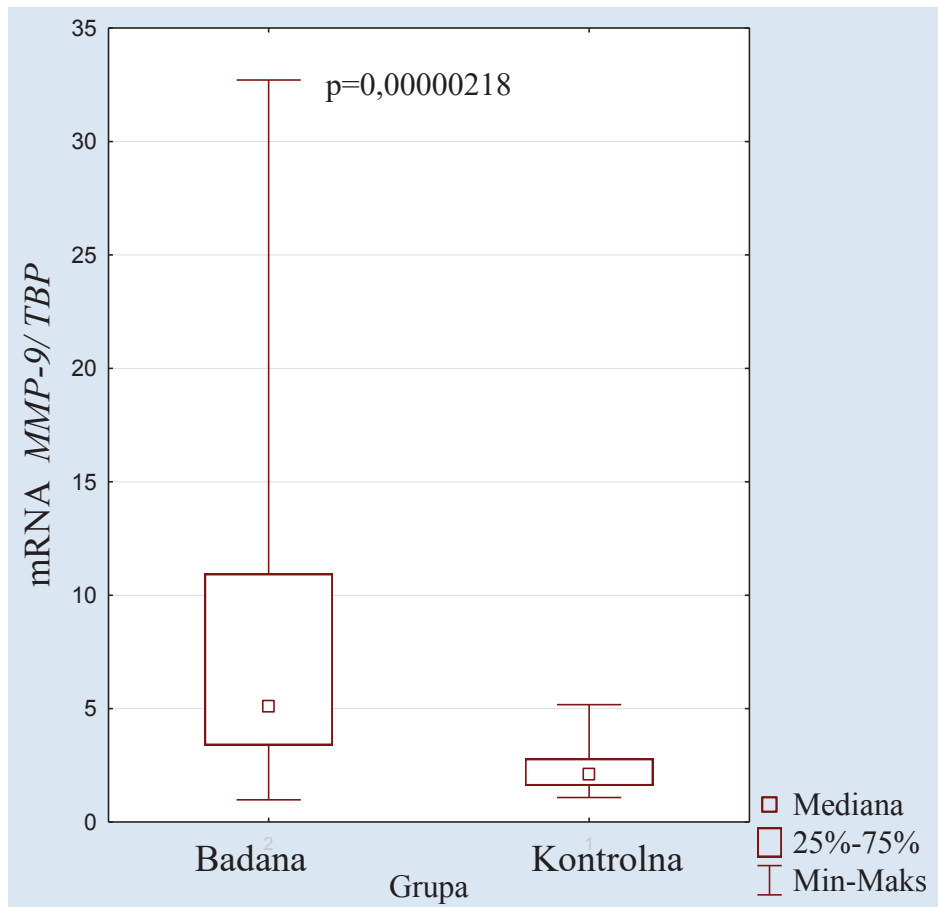


**Rycina 30 B.** Ekspresja genu *TNF- $\alpha$*  w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną na poziomie białka  
**Figure 30 B.** Expression of *TNF- $\alpha$*  gene in biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket on the protein level

#### 4.5.5 Ocena poziomu ekspresji genu dla MMP-9 u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną

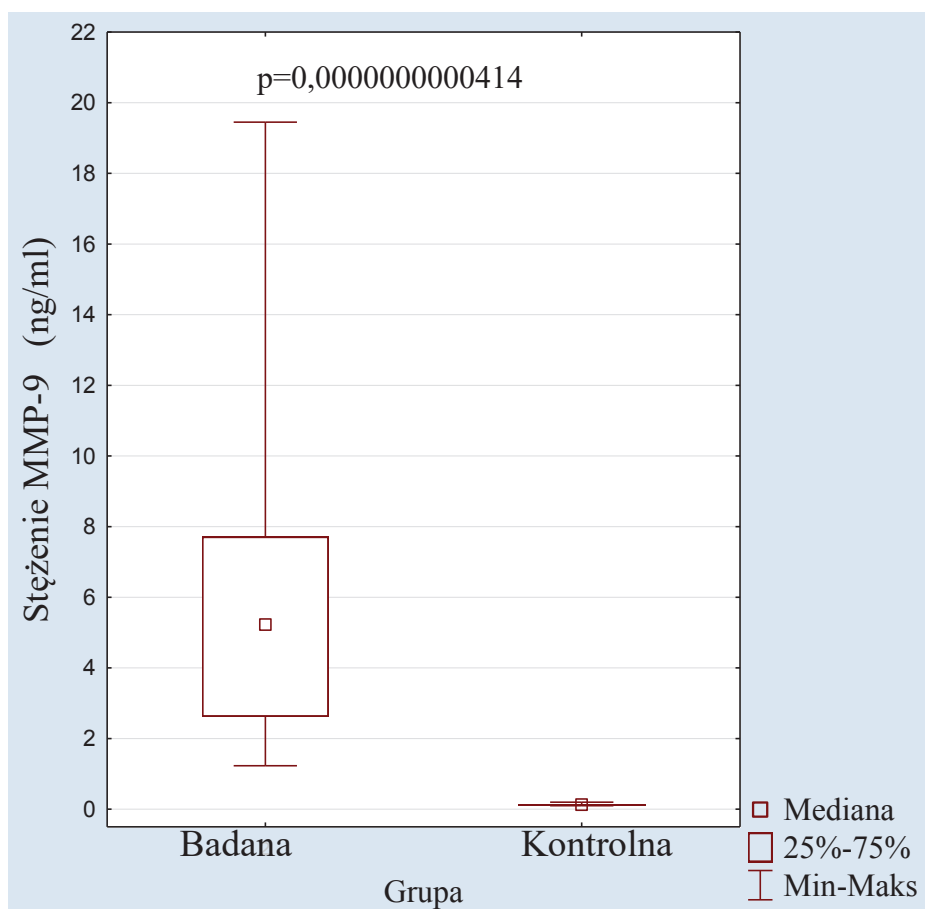
W grupie badanej ( $n=35$ ) poziom ekspresji genu *MMP-9* w stosunku do genu referencyjnego (TBP, ang. *TATA-binding protein*), określony za pomocą metody RT-PCR w czasie rzeczywistym (tab. 4), wartość środkowa wynosiła 5,105 i była wyższa ( $\times 2,41$ ) niż w materiale biologicznym pobranym ze zwłok ( $n=25$ ), gdzie  $M=2,115$ ,  $p=0,00000218$  (ryc. 31 A).

Za pomocą testu ELISA określono stężenie MMP-9 (ryc. 31 B). W grupie badanej ( $n=35$ ) stężenie MMP-9 wynosiło  $M= 5,23\mu\text{g/ml}$  i było znacznie wyższe ( $\times 40,23$ ) niż w materiale biologicznym pobranym ze zwłok ( $n=25$ ), w którym stężenie białka wynosiło  $M= 0,13\mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,0000000000414$ .



**Rycina 31 A.** Ekspresja genu *MMP-9* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną na poziomie mRNA  
**Figure 31 A.** Expression of *MMP-9* gene in biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket on the mRNA level



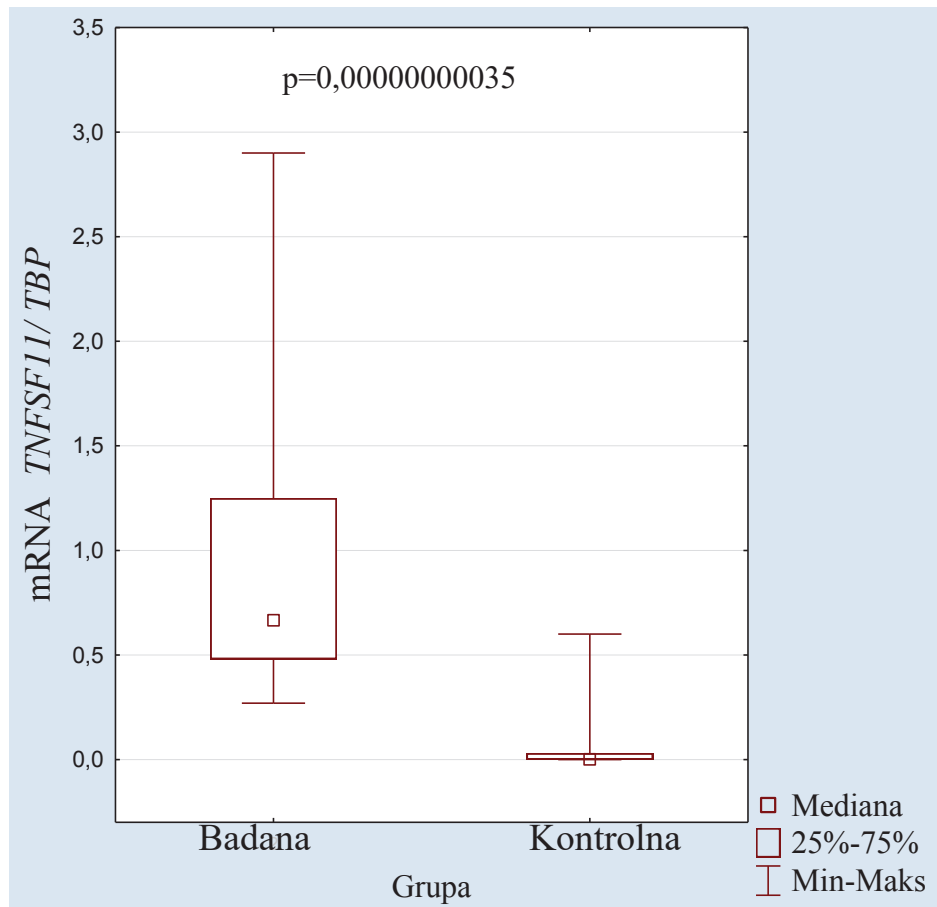


**Rycina 31 B.** Ekspresja genu *MMP-9* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną na poziomie białka  
**Figure 31 B.** Expression of *MMP-9* gene in biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket on the protein level

#### 4.5.6 Ocena poziomu ekspresji genu dla RANKL u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną

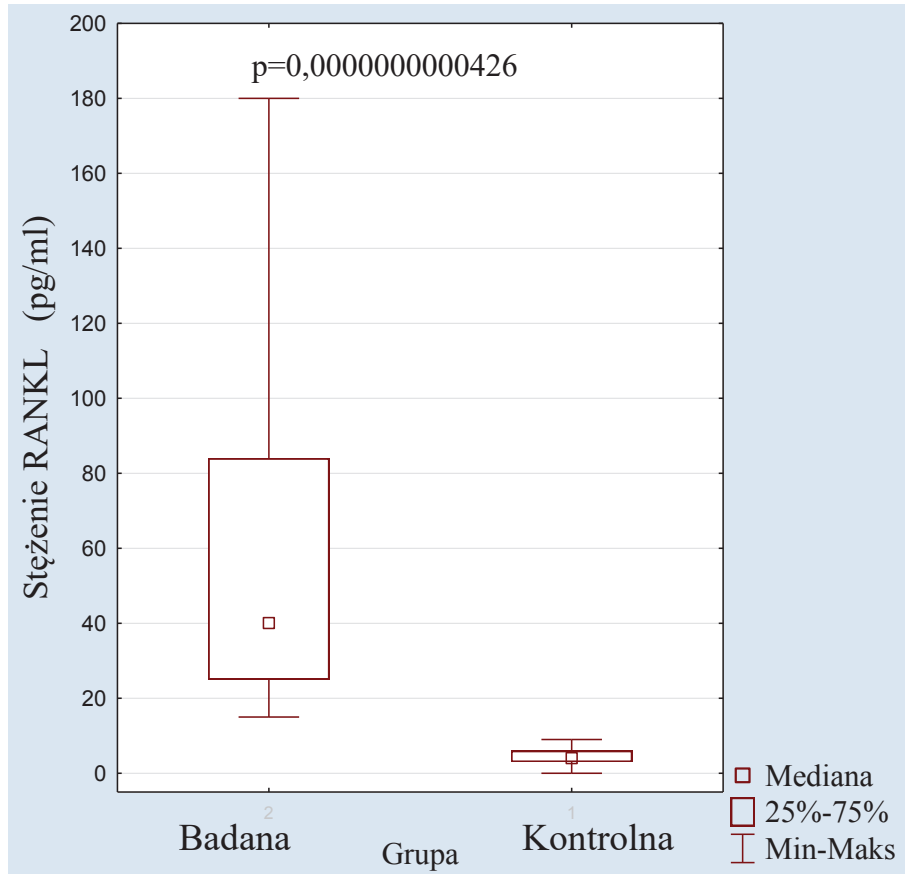
U chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną dochodzi do znacznego wzrostu poziomu mRNA dla genu *TNFSF11* (x2714). Wartość środkowa ( $M$ ) w grupie badanej wynosi 0,665 a w grupie kontrolnej  $M=0,000245$ ;  $p=0,00000000035$  (ryc. 32 A).

Wykonano test ELISA, w którym określono stężenie RANKL (ryc. 32 B). W grupie badanej ( $n=35$ ) stężenie RANKL wynosiło  $M= 40\text{pg/ml}$  i było znacznie wyższe (x10) niż w materiale biologicznym pobranym ze zwłok, w którym wynosiło  $M= 4\text{pg/ml}$ ,  $p=0,000000000426$ .



**Rycina 32 A.** Ekspresja genu *TNFSF11* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną na poziomie mRNA

**Figure 32 A.** Expression of *TNFSF11* in biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket on the mRNA level



**Rycina 32 B.** Ekspresja genu *TNFSF11* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną na poziomie białka

**Figure 32.** Expression of *TNFSF11* in biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket on the protein level

#### 4.5.7 Korelacja między oznaczonym poziomem mRNA a poziomem białka w analizie ekspresji badanych genów

Ekspresja genu jest procesem wieloetapowym, ściśle regulowanym na wielu poziomach. Najczęściej wzrost lub spadek poziomu mRNA dla danego genu skutkuje wzrostem lub spadkiem poziomu białka. Jednak niekiedy w procesach patologicznych, na przykład w procesie nowotworowym, nie obserwuje się dodatkowej korelacji między ilością mRNA a ilością białka danego genu [71].

Dlatego też sprawdzono stopień zależności poziomu mRNA danego transkryptu do ilości białka zarówno w całej analizowanej populacji jak i w poszczególnych jej grupach (badana, kontrolna) (tab. 10, 11, 12).

**Tabela 10.** Korelacja między poziomem mRNA badanych genów a poziomem ich produktu białkowego ( $p < 0,05$ ) w materiale biologicznym obu grup ( $n=60$ )

**Table 10.** The correlation between mRNA levels of the studied gene and level of the protein product ( $p < 0.05$ ) in the biological material both groups ( $n=60$ )

Gen \ Białko	<i>IL-1<math>\alpha</math></i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-10</i>	<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	<i>MMP-9</i>	<i>TNFSF11</i>
<b>IL-1<math>\alpha</math>*</b>	0,87					
<b>IL-6*</b>		0,29				
<b>IL-10*</b>			0,88			
<b>TNF-<math>\alpha</math>*</b>				0,78		
<b>MMP-9*</b>					0,81	
<b>RANKL*</b>						0,84

W tabeli przedstawiono wartość współczynnika korelacji rangowej R Spearmana. Kursywą oznaczono ekspresję genów badanych cytokin; „\*” - oznaczono stężenie badanych cytokin.

**Tabela 11.** Korelacja między poziomem mRNA badanych genów a poziomem ich produktu białkowego ( $p < 0,05$ ) w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną ( $n=35$ )

**Table 11.** The correlation between mRNA levels of the studied genes and level of the protein product ( $p < 0.05$ ) in biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket ( $n=35$ )

Gen \ Białko	<i>IL-1<math>\alpha</math></i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-10</i>	<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	<i>MMP-9</i>	<i>TNFSF11</i>
<b>IL-1<math>\alpha</math>*</b>	0,5					
<b>IL-6*</b>		-0,16				
<b>IL-10*</b>			0,75			
<b>TNF-<math>\alpha</math>*</b>				0,49		
<b>MMP-9*</b>					0,91	
<b>RANKL*</b>						0,53

W tabeli przedstawiono wartość współczynnika korelacji rangowej R Spearmana. Korelacja istotna z  $p < 0,05$ . Kursywą oznaczono ekspresję genów badanych cytokin; „\*” - oznaczono stężenie badanych cytokin.

**Tabela 12.** Korelacja między poziomem mRNA badanych genów a poziomem ich produktu białkowego ( $p < 0,05$ ) w materiale biologicznym w grupie kontrolnej ( $n=25$ )

**Table 12.** The correlation between mRNA levels of the studied genes and level of the protein product ( $p < 0.05$ ) in biological material in the control group ( $n=25$ )

Gen \ Białko	<i>IL-1<math>\alpha</math></i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-10</i>	<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	<i>MMP-9</i>	<i>TNFSF11</i>
<b>IL-1<math>\alpha</math>*</b>	0,55					
<b>IL-6*</b>		0,15				
<b>IL-10*</b>			0,28			
<b>TNF-<math>\alpha</math>*</b>				-0,14		
<b>MMP-9*</b>					0,21	
<b>RANKL*</b>						0,44

W tabeli przedstawiono wartość współczynnika korelacji rangowej R Spearmana. Korelacja istotna z  $p < 0,05$ . Kursywą oznaczono ekspresję genów badanych cytokin; „\*” - oznaczono stężenie badanych cytokin.

Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykonana przy użyciu współczynnika korelacji rang Spearmana pokazała, że istnieje znamieny statystycznie związek między poziomem mRNA danego genu a jego produktem białkowym (tab. 11) w całej populacji, tj. w grupie kontrolnej i badanej ( $n=60$ ). Najsilniejszą korelację zaobserwowano między ilością mRNA dla genu *IL-1 $\alpha$*  ( $R=0,87$ ) i *IL-10* ( $R=0,88$ ) a stężeniem ich białek. Najsłabszy związek jest między mRNA *IL-6* ( $R=0,29$ ) a jego produktem białkowym.

Ponadto dokonano porównania między poziomami mRNA badanych genów a poziomami białka w poszczególnych grupach: badanej ( $n=35$ ) i kontrolnej ( $n=25$ ). Co ciekawe, podobny stopień korelacji zaobserwowano w dwóch analizowanych grupach jedynie dla ekspresji genu *IL-1 $\alpha$*  i *TNFSF11*. W przypadku ekspresji genów *IL-6*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$*  i *MMP-9* stopień korelacji znacznie się różni w obu grupach. W przypadku ekspresji genu *IL-6* zaobserwowano słabą korelację w populacji ogólnej ( $n=60$ ,  $R=0,29$ ), grupie badanej ( $R= -0,15$ ) i grupie kontrolnej ( $R=0,14$ ). Ciekawostką jest to, że w grupie badanej ten związek jest ujemny, a w grupie kontrolnej – dodatni. Podobną sytuację zaobserwowano w analizie ekspresji genu *TNF- $\alpha$* , gdzie w grupie badanej stwierdzono przeciętną dodatnią korelację ( $R=0,48$ ) a w grupie kontrolnej wykryto ujemny związek ( $R= -0,14$ ) między poziomem mRNA *TNF- $\alpha$*  a poziomem białka *TNF- $\alpha$* . Poziom korelacji dla *TNF- $\alpha$*  w populacji ogólnej był bardzo wysoki ( $R=0,76$ ). Zaobserwowane różnice w ekspresji genów *IL-6* i *TNF- $\alpha$*  między grupą badaną a kontrolną mogą wynikać ze skrócenia czasu półtrwania ( $t_{1/2}$ ) w/wym. cytokin w niektórych stanach patologicznych [61, 65, 116, 135].

Analizując poziom ekspresji genu *IL-10* wykryto bardzo wysoki poziom korelacji ( $R=0,75$ ) dla produktu białkowego w grupie chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną.

W grupie kontrolnej ten związek jest słaby ( $R=0,28$ ). W bardzo podobny sposób do poziomu ekspresji genu *IL-10* zachowuje się poziom ekspresji genu *MMP-9*.

W populacji ogólnej wykryto bardzo wysoki poziom korelacji ( $R=0,81$ ) między poziomem mRNA danego genu a jego produktem białkowym. W grupie badanej zaobserwowano prawie pełną korelację ( $R=0,91$ ) między ilością mRNA dla genu *MMP-9* a stężeniem jego białka. W grupie kontrolnej ten związek jest słaby ( $R=0,21$ ).

#### **4.5.8 Zależność między poziomem ekspresji badanych genów a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną**

##### **4.5.8.1 Korelacja między poziomem ekspresji genu *IL-1 $\alpha$* a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną**

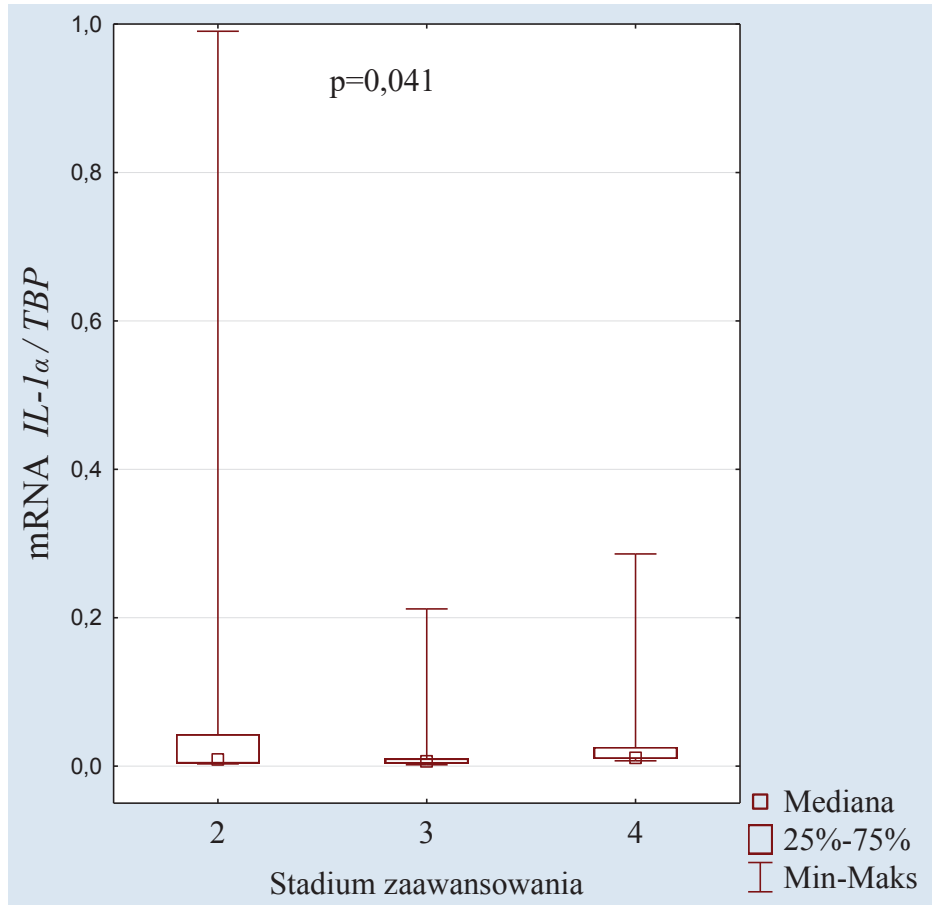
Dokonano analizy statystycznej i poszukiwanie korelacji między poziomem ekspresji genu *IL-1 $\alpha$*  a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi. W analizie uwzględniono wiek i płeć pacjentów, typ niedosłuchu i jego poziom, typ kieszonki retrakcyjnej i stopień zaawansowania choroby, obecność wycieków z ucha, szumów usznych, zawrotów głowy, obecność tkanki ziarninowej w obrębie ucha środkowego i zewnętrznego, perforacji błony bębenkowej.

**Tabela 13.** Korelacja między poziomem mRNA dla genu *IL-1 $\alpha$*  a wybranymi cechami klinicznymi ( $p < 0,05$ )

*Table 13.* The correlation between the level of mRNA for *IL-1 $\alpha$*  gene and selected clinical features ( $p < 0.05$ )

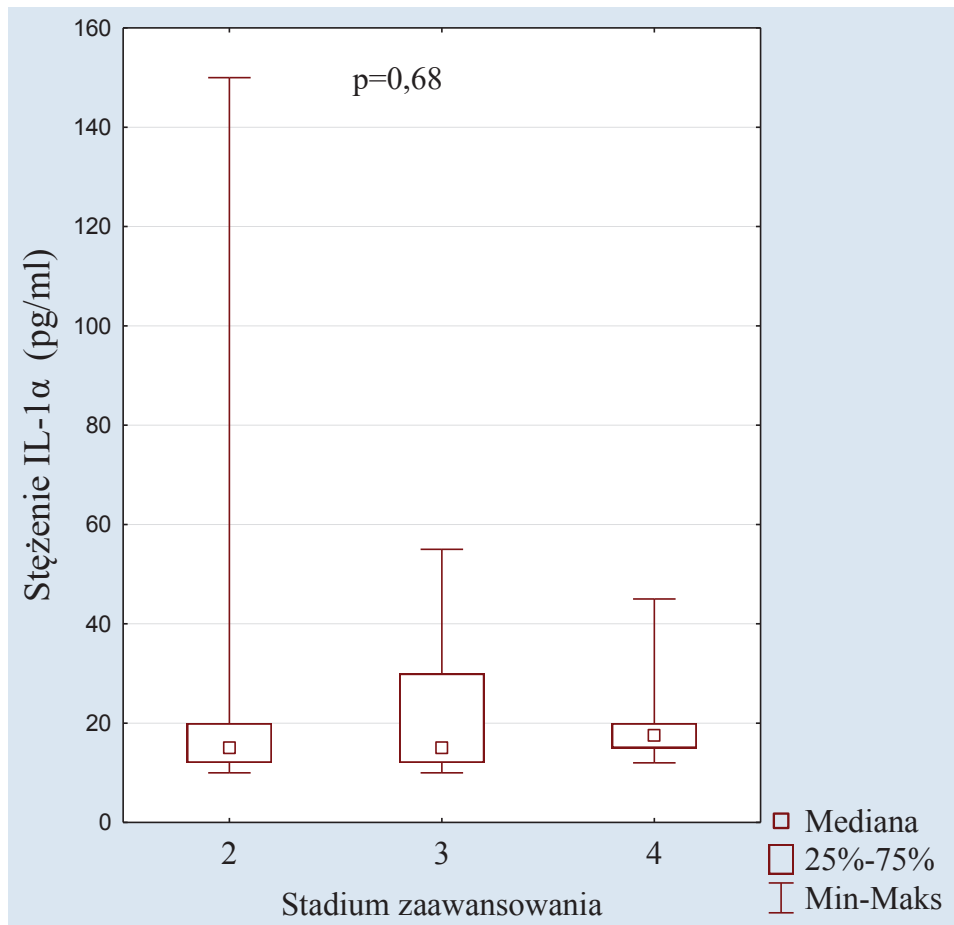
	<b>Stopień zaawansowania KR</b>	<b>Perforacja BB</b>	<b>Wyciek</b>	<b>Ziarnina</b>
<i>IL-1<math>\alpha</math></i>	0,3	0,17	0,18	0,26

W tabeli przedstawiono wartość współczynnika korelacji rangowej R Spearmana.



**Rycina 33 A.** Porównanie poziomu ekspresji genu *IL-1 $\alpha$*  w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną błony bębenkowej ( $n=35$ ) w różnych stopniach jej zaawansowania ( $p<0,05$ ) na poziomie mRNA

**Figure 33 A.** Comparing the level of gene expression of *IL-1 $\alpha$*  in the biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket of the tympanic membrane ( $n = 35$ ) at various degrees of its advancement ( $p < 0.05$ ) on the mRNA level



**Rycina 33 B.** Porównanie poziomu ekspresji genu *IL-1 $\alpha$*  w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną błony bębenkowej (n=35) w różnych stopniach jej zaawansowania ( $p < 0,05$ ) na poziomie białka

**Figure 33 B.** Comparing the level of gene expression of *IL-1 $\alpha$*  in the biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket of the tympanic membrane ( $n = 35$ ) at various degrees of its advancement ( $p < 0.05$ ) on the protein level



#### 4.5.8.2 Korelacja między poziomem ekspresji genu *IL-6* a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną

Dokonano analizy statystycznej z określeniem zależności między poziomem ekspresji genu *IL-6* a danymi demograficznymi i cechami klinicznymi.

W analizie uwzględniono wiek i płeć pacjentów, typ niedosłuchu i jego poziom, typ kieszonki retrakcyjnej i stopień zaawansowania choroby, obecność wycieków z ucha, szumów usznych, zawrotów głowy, obecność tkanki ziarninowej w obrębie ucha środkowego i zewnętrznego oraz perforacji błony bębenkowej.

**Tabela 14.** Korelacja między poziomem mRNA dla genu *IL-6* a wybranymi cechami klinicznymi ( $p < 0,05$ )

**Table 14.** The correlation between the level of mRNA for *IL-6* gene and selected clinical features ( $p < 0.05$ )

	Stopień zaawansowania KR	Perforacja BB	Wyciek	Ziarnina	Szum uszny	Zawroty głowy
<i>IL-6</i>	-0,15	-0,31	-0,3	-0,16	-0,3	-0,23

W tabeli przedstawiono wartość współczynnika korelacji rangowej R Spearmana.

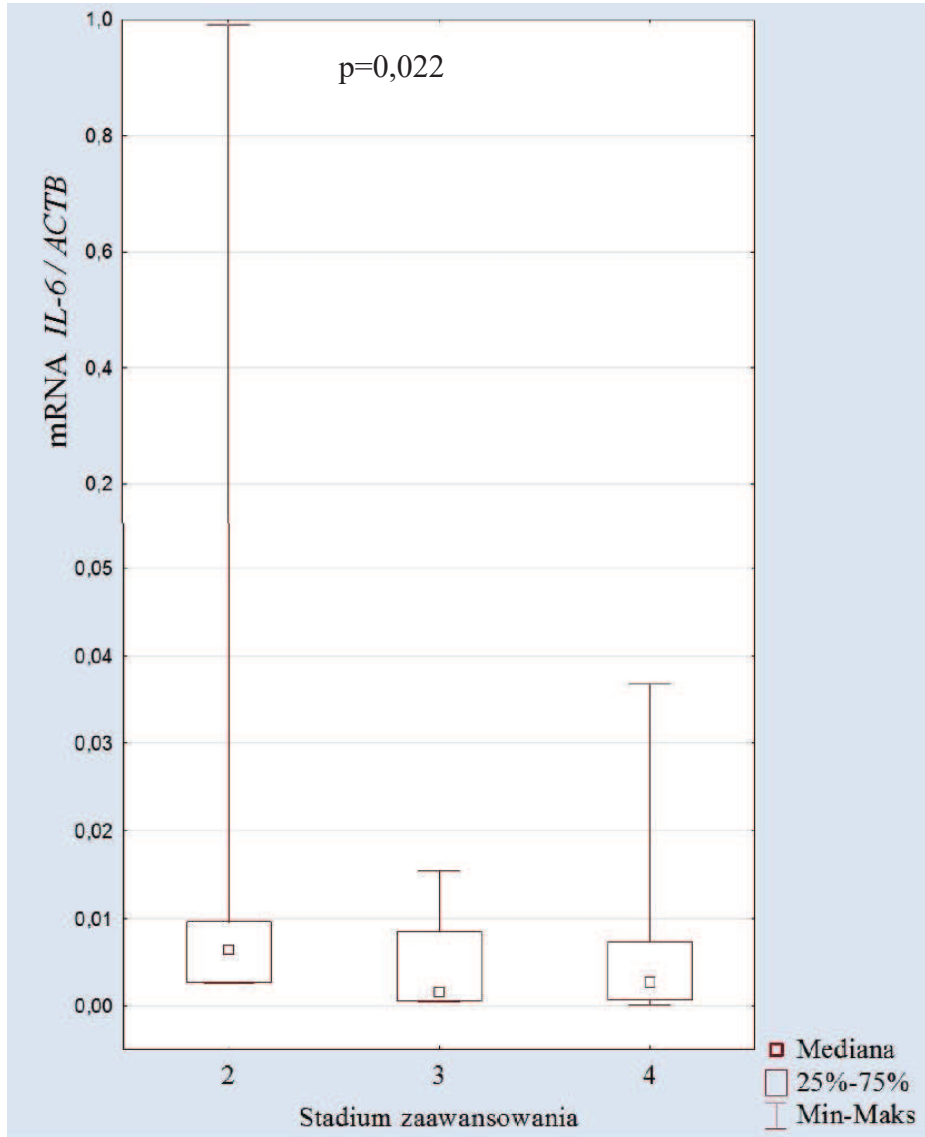
**Tabela 15.** Korelacja między stężeniem *IL-6* a wybranymi cechami klinicznymi ( $p < 0,05$ )

**Table 15.** The correlation between the concentration of *IL-6* and selected clinical features ( $p < 0.05$ )

	Stopień zaawansowania KR	Perforacja BB	Wyciek	Ziarnina
<i>IL-6</i>	0,82	0,41	0,42	0,53

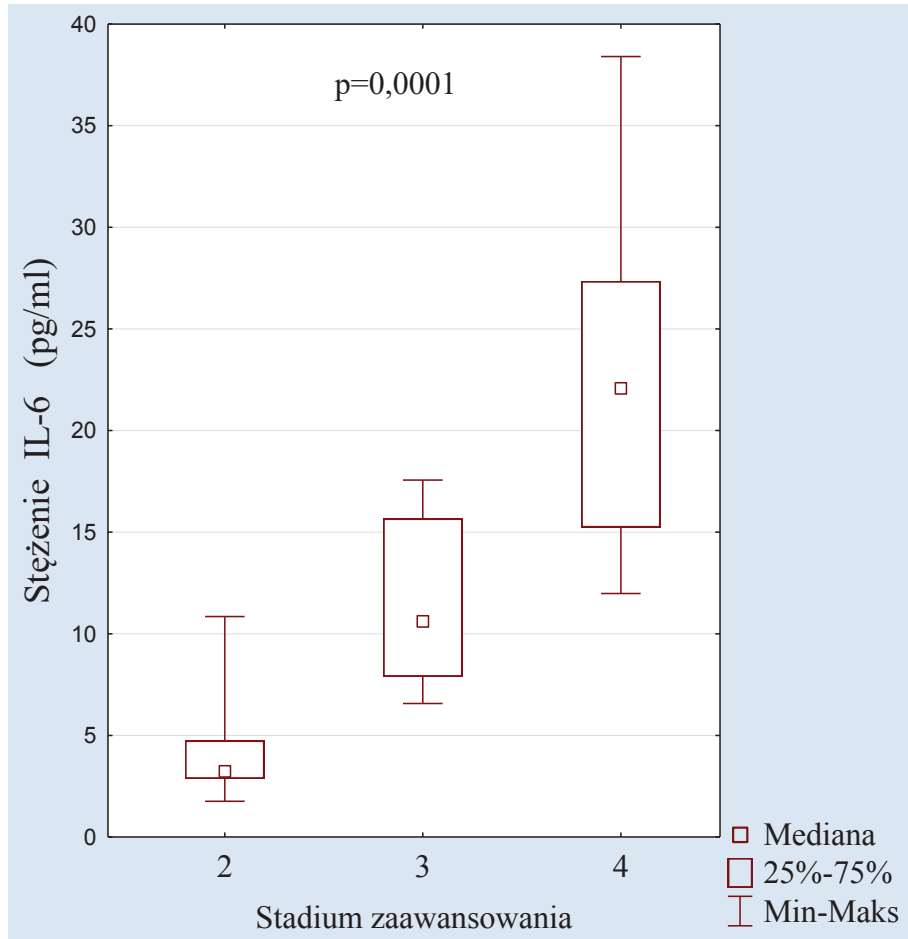
W tabeli przedstawiono wartość współczynnika korelacji rangowej R Spearmana.

W przypadku analizy uzyskanych danych dotyczących stężenia *IL-6* zaobserwowano wzrost stężenia danego białka ze zwiększeniem stopnia zaawansowania KR błony bębenkowej (ryc. 34 A i B).



**Rycina 34 A.** Porównanie poziomu ekspresji genu *IL-6* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną w różnych stopniach jej zaawansowania ( $p < 0,05$ ) na poziomie mRNA

**Figure 34 A.** Comparing the level of gene expression of *IL-6* in the biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket of the tympanic membrane at various degrees of its advancement ( $p < 0.05$ ) on the mRNA level



**Rycina 34 B.** Porównanie poziomu ekspresji genu *IL-6* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną w różnych stopniach jej zaawansowania ( $p < 0,05$ ) na poziomie białka

**Figure 34 B.** Comparing the level of gene expression of *IL-6* in the biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket of the tympanic membrane at various degrees of its advancement ( $p < 0.05$ ) on the protein level

#### 4.5.8.3 Korelacja między poziomem ekspresji genu *IL-10* a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną

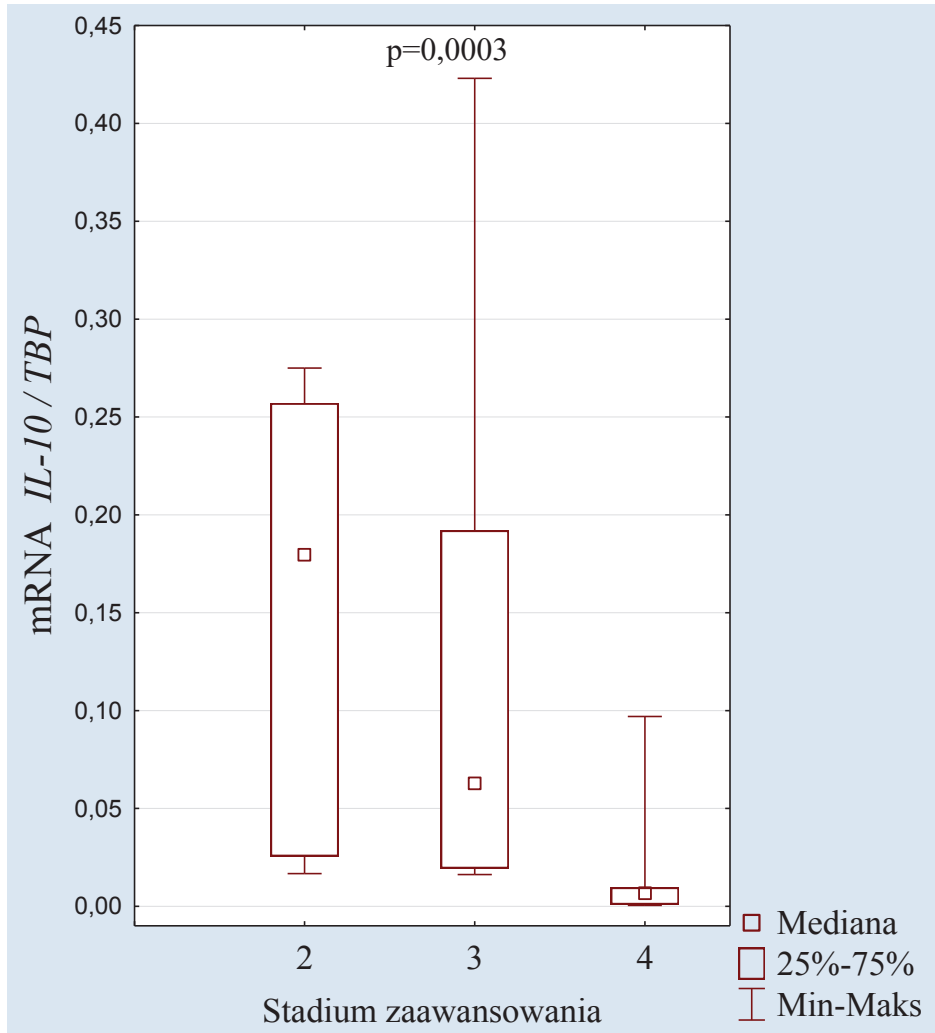
Dokonano analizy statystycznej i poszukiwania korelacji między poziomem ekspresji genu *IL-10* a danymi demograficznymi i cechami klinicznymi. W analizie uwzględniono wiek i płeć pacjentów, typ niedosłuchu i jego poziom, typ kieszonki retrakcyjnej i stopień zaawansowania choroby, obecność wycieków z ucha, szumów usznych, zawrotów głowy, obecność tkanki ziarninowej w obrębie ucha środkowego i zewnętrznego oraz perforacji błony bębenkowej.

**Tabela 16.** Korelacja między określonym poziomem mRNA dla genu *IL-10* a wybranymi danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi ( $p < 0,05$ )

**Table 16.** The correlation between a certain level of mRNA for the gene *IL-10* and selected demographic data and clinical features ( $p < 0.05$ )

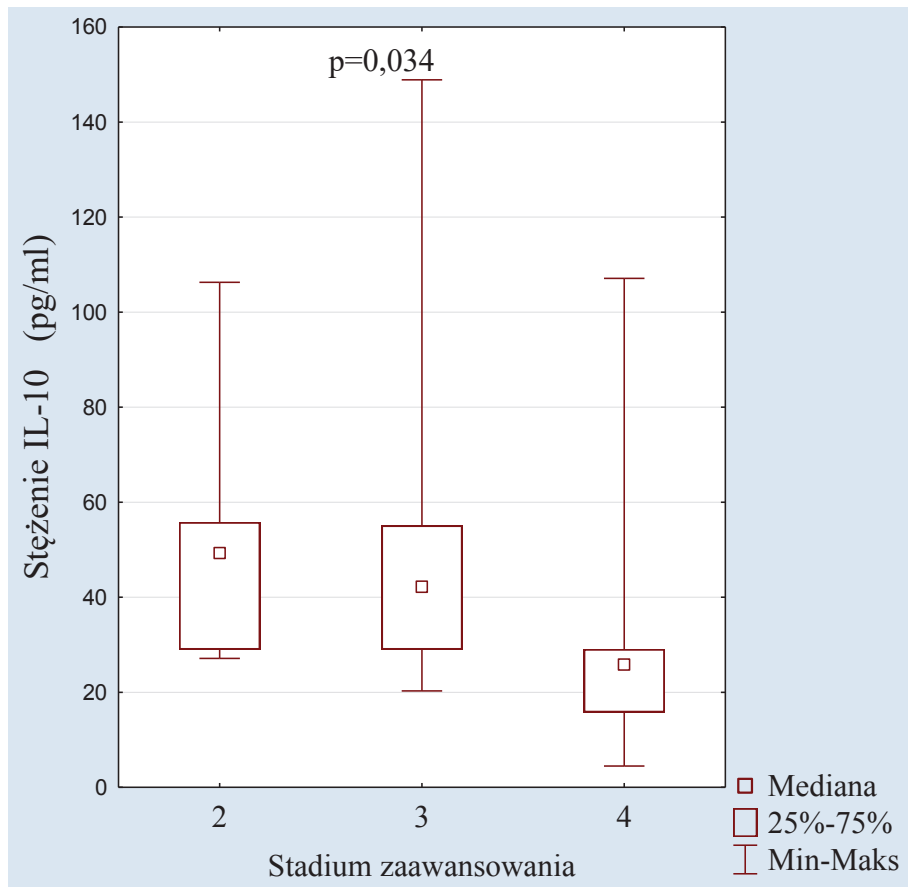
	Stopień zaawansowania KR	Perforacja BB	Ziarnina
<i>IL-10</i>	-0,68	-0,14	-0,22

W tabeli przedstawiono wartość współczynnika korelacji rangowej R Spearmana.



**Rycina 35 A.** Porównanie poziomu ekspresji genu *IL-10* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną w różnych stopniach jej zaawansowania ( $p < 0,05$ ) na poziomie mRNA

**Figure 35 A.** Comparing the level of gene expression of *IL-10* in the biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket of the tympanic membrane at various degrees of its advancement ( $p < 0.05$ ) on the mRNA level



**Rycina 35 B.** Porównanie poziomu ekspresji genu *IL-10* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną w różnych stopniach jej zaawansowania ( $p < 0,05$ ) na poziomie białka

**Figure 35 B.** Comparing the level of gene expression of *IL-10* in the biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket of the tympanic membrane at various degrees of its advancement ( $p < 0.05$ ) on the protein level

#### 4.5.8.4 Korelacja między poziomem ekspresji genu *TNF- $\alpha$* a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej i wykonano poszukiwanie korelacji między poziomem ekspresji genu *TNF- $\alpha$*  a danymi demograficznymi i cechami klinicznymi. W analizie uwzględniono wiek i płeć pacjentów, typ niedosłuchu i jego poziom, typ kieszonki retrakcyjnej i stopień zaawansowania choroby, obecność wycieków z ucha, szumów usznych, zawrotów głowy, obecność tkanki ziarninowej w obrębie ucha środkowego i zewnętrznego oraz perforacji błony bębenkowej.

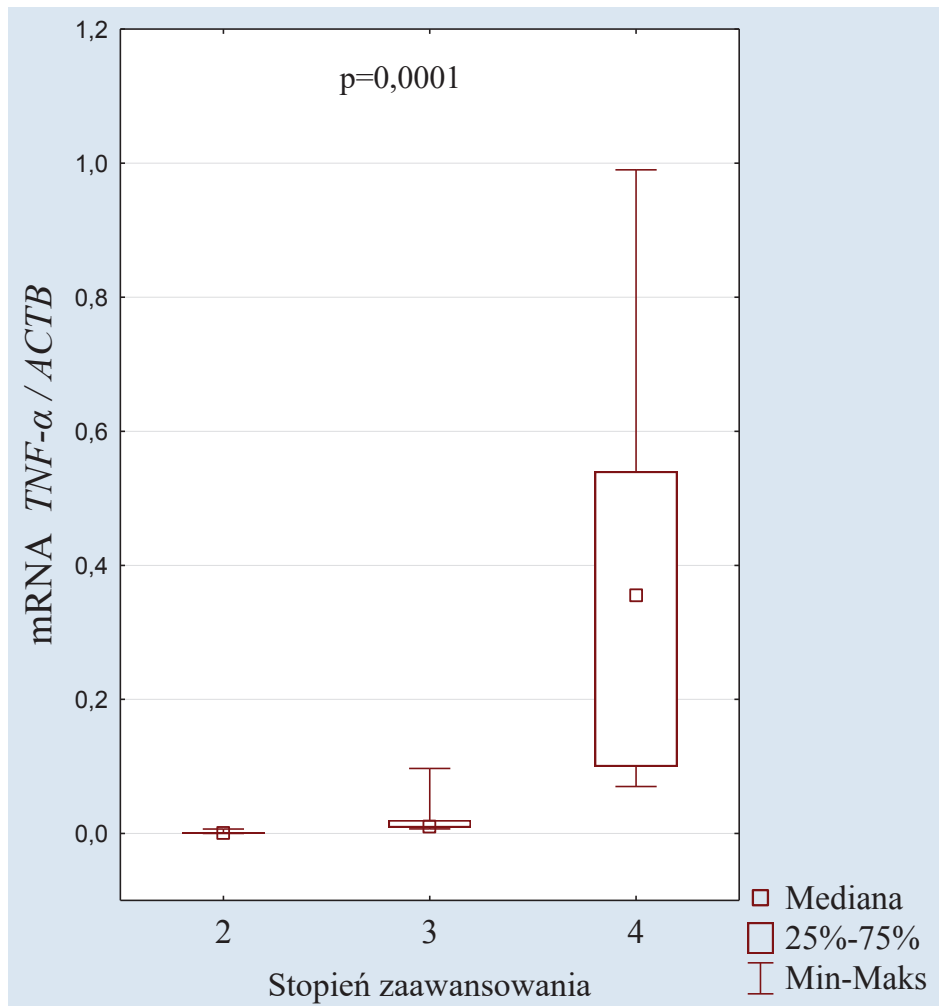
**Tabela 17.** Korelacja między poziomem mRNA dla genu *TNF- $\alpha$*  a wybranymi cechami klinicznymi ( $p < 0,05$ )

**Table 17.** The correlation between the levels of mRNA for *TNF- $\alpha$*  gene and selected clinical features ( $p < 0.05$ )

	Stopień zaawansowania KR	Perforacja BB	Ziarnina	Wyciek
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	0,91	0,41	0,37	0,35

W tabeli przedstawiono wartość współczynnika korelacji rangowej R Spearmana.

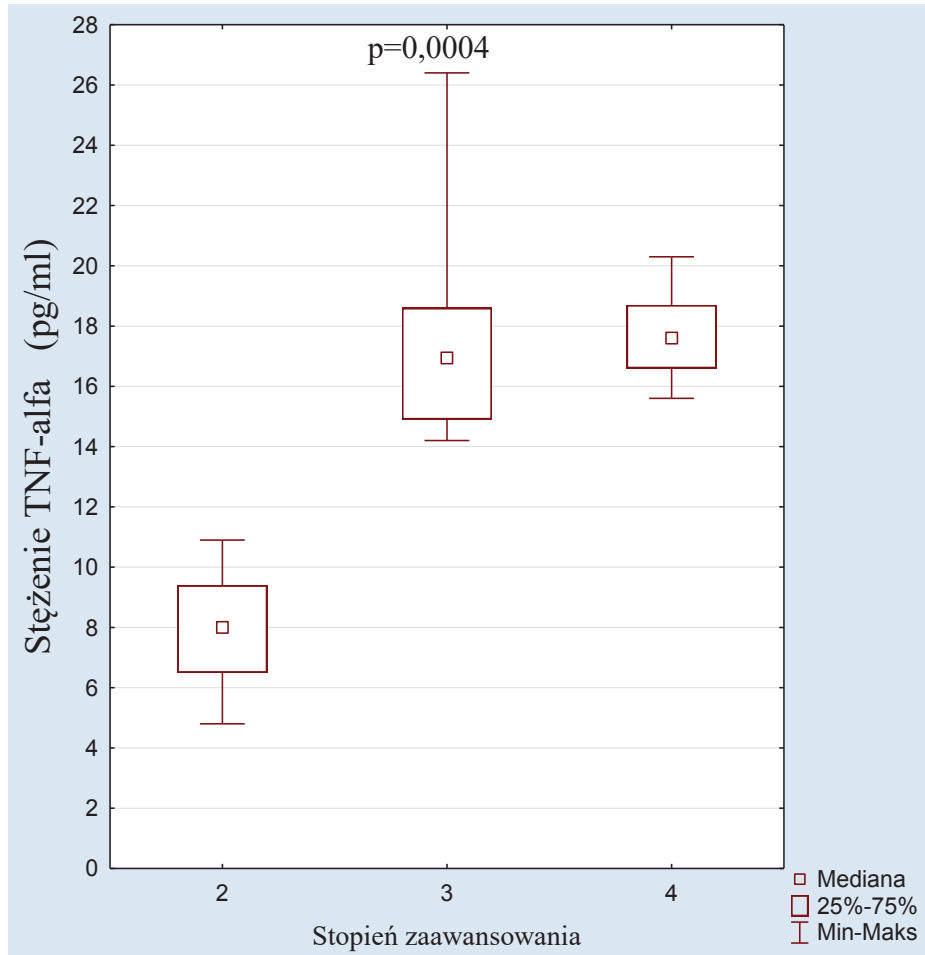
W przypadku analizy uzyskanych danych dotyczących stężenia *TNF- $\alpha$*  zaobserwowano podwyższenie stężenia danego białka w bardziej zaawansowanych stopniach rozwoju KR błony bębenkowej w stosunku do wczesnego stopnia jej rozwoju (ryc. 36 A i B).



**Rycina 36 A.** Porównanie poziomu ekspresji genu *TNF-α* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną w różnych stopniach jej zaawansowania ( $p < 0,05$ ) na poziomie mRNA

**Figure 36 A.** Comparing the level of gene expression of *TNF-α* in the biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket of the tympanic membrane at various degrees of its advancement ( $p < 0.05$ ) on the mRNA level



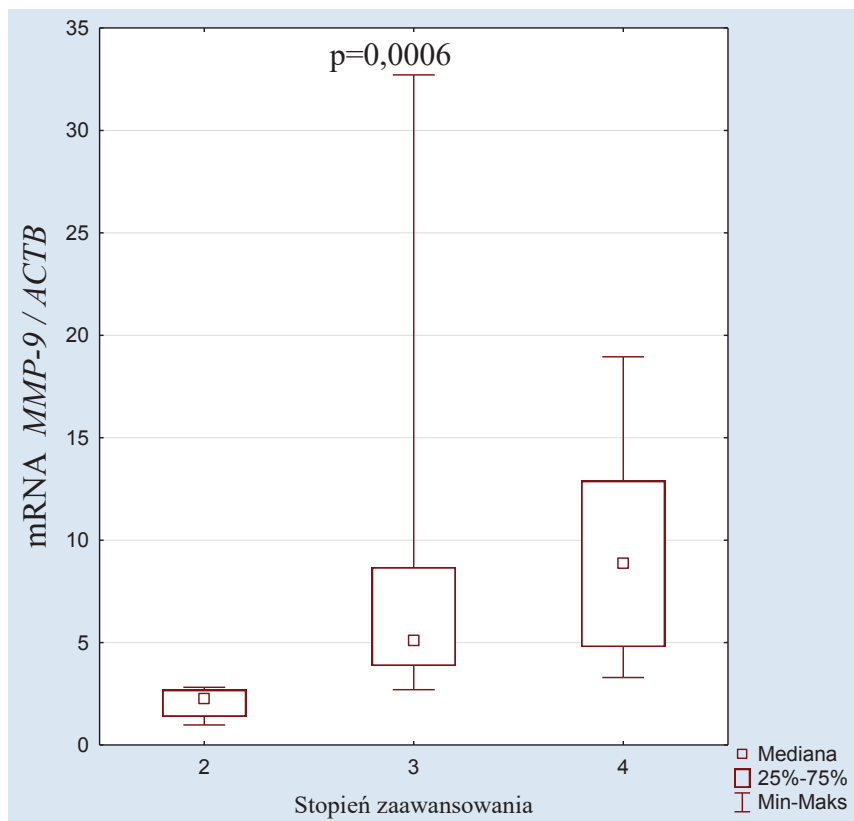


**Rycina 36 B.** Porównanie poziomu ekspresji genu *TNF- $\alpha$*  w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną w różnych stopniach jej zaawansowania ( $p < 0,05$ ) na poziomie białka

**Figure 36 B.** Comparing the level of gene expression of *TNF- $\alpha$*  in the biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket of the tympanic membrane at various degrees of its advancement ( $p < 0.05$ ) on the protein level

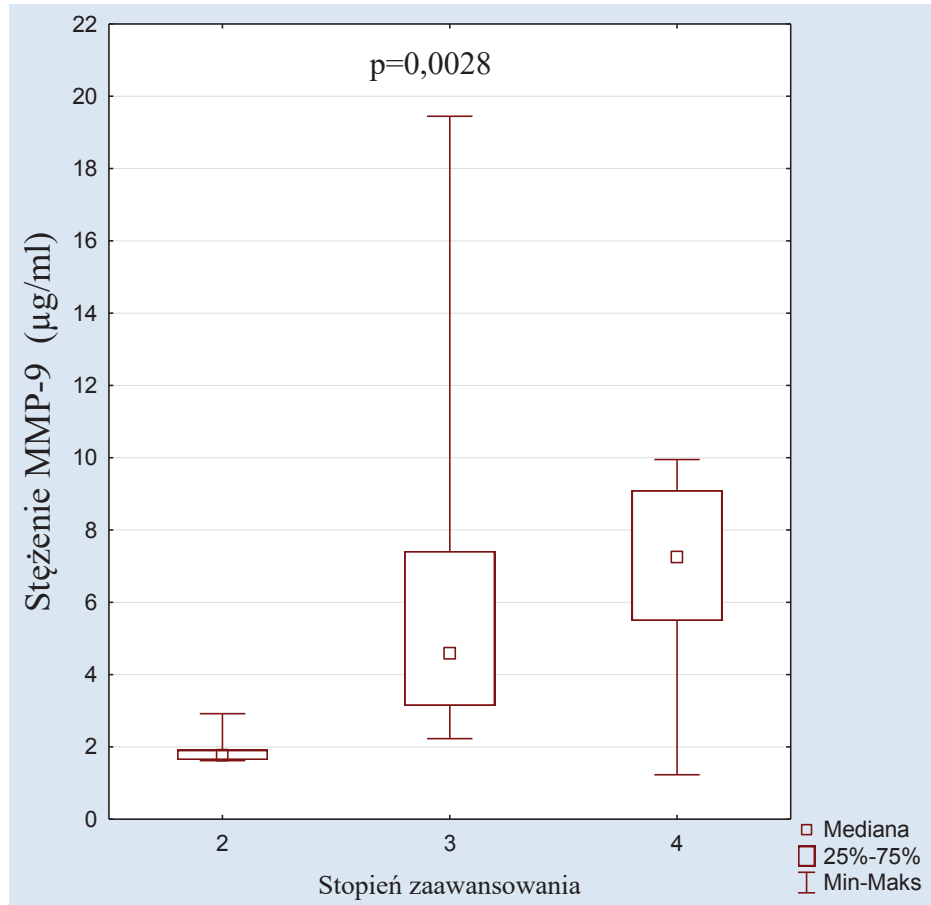
#### 4.5.8.5 Korelacja między poziomem ekspresji genu *MMP-9* a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej i określono zależności między poziomem ekspresji genu *MMP-9* a cechami demograficznymi i klinicznymi. W analizie uwzględniono wiek i płeć pacjentów, typ niedosłuchu i jego poziom, typ kieszonki retrakcyjnej i stopień zaawansowania choroby, obecność wycieków z ucha, szumów usznych, zawrotów głowy, obecność tkanki ziarninowej w obrębie ucha środkowego i zewnętrznego oraz perforacji błony bębenkowej.



**Rycina 37 A.** Porównanie poziomu ekspresji genu *MMP-9* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną w różnych stopniach jej zaawansowania ( $p < 0,05$ ) na poziomie mRNA

**Figure 37 A.** Comparing the level of gene expression of *MMP-9* in the biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket of the tympanic membrane at various degrees of its advancement ( $p < 0.05$ ) on the mRNA level



**Rycina 37 B.** Porównanie poziomu ekspresji genu *MMP-9* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną w różnych stopniach jej zaawansowania ( $p < 0,05$ ) na poziomie białka

**Figure 37 B.** Comparing the level of gene expression of *MMP-9* in the biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket of the tympanic membrane at various degrees of its advancement ( $p < 0.05$ ) on the protein level

#### 4.5.8.6 Zależność między poziomem ekspresji genu *TNFSF11* a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej i poszukiwano korelacji między poziomem ekspresji genu *TNFSF11* a danymi demograficznymi i cechami klinicznymi. W analizie uwzględniono wiek i płeć pacjentów, typ niedosłuchu i jego poziom, typ kieszonki retrakcyjnej i stopień zaawansowania choroby, obecność wycieków z ucha, szumów usznych, zawrotów głowy, obecność tkanki ziarninowej w obrębie ucha środkowego i zewnętrznego oraz perforacji błony bębenkowej.

**Tabela 18.** Korelacja między poziomem mRNA dla genu *TNFSF11* a wybranymi cechami klinicznymi ( $p < 0,05$ )

**Table 18.** The correlation between the level of mRNA for the gene *TNFSF11* and selected clinical features ( $p < 0.05$ )

	Stopień zaawansowania KR	Wyciek	Perforacja	Ziarnina
<i>TNFSF11</i>	0,92	0,37	0,45	0,51

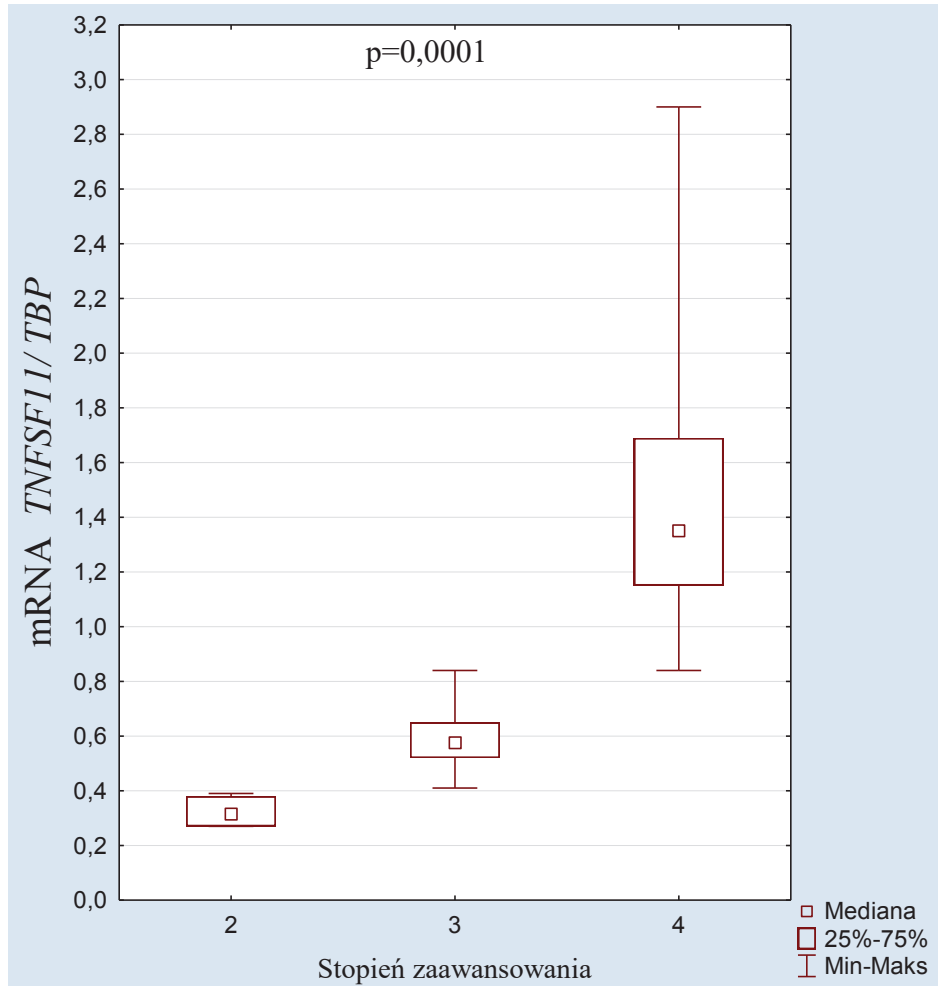
W tabeli przedstawiono wartość współczynnika korelacji rangowej R Spearmana.

**Tabela 19.** Związek między stężeniem RANKL a cechami klinicznymi u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną ( $p < 0,05$ )

**Table 19.** The relationship between levels of RANKL and clinical features of patients with chronic otitis media with retraction pocket ( $p < 0.05$ )

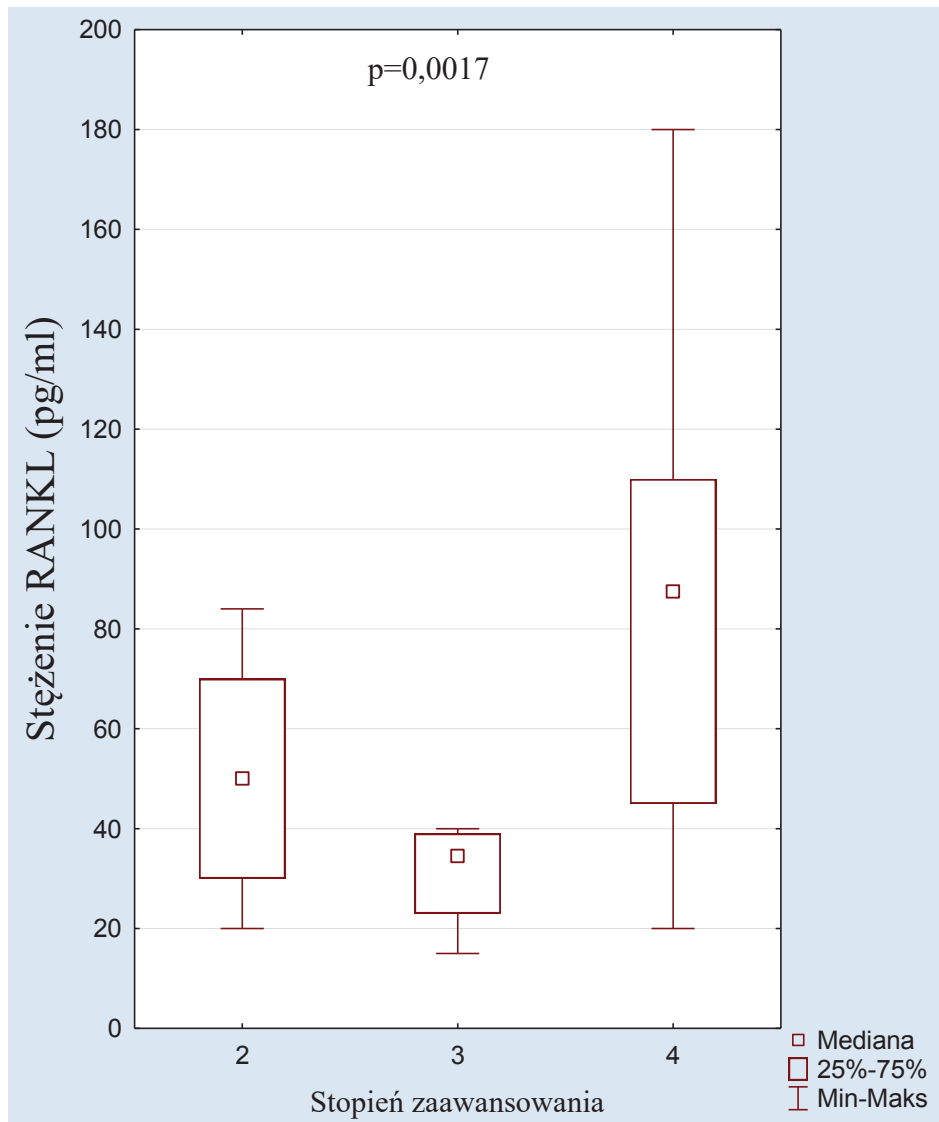
	Typ KR	Stopień zaawansowania KR	Ziarnina
RANKL	-0,5	0,45	0,41

W tabeli przedstawiono wartość współczynnika korelacji rangowej R Spearmana.



**Rycina 38 A.** Porównanie poziomu ekspresji genu *TNFSF11* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną w różnych stopniach jej zaawansowania ( $p < 0,05$ ) na poziomie mRNA

**Figure 38 A.** Comparing the level of gene expression of *TNFSF11* in the biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket of the tympanic membrane at various degrees of its advancement ( $p < 0.05$ ) on the mRNA level



**Rycina 38 B.** Porównanie poziomu ekspresji genu *TNFSF11* w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną w różnych stopniach jej zaawansowania ( $p < 0,05$ ) na poziomie białka RANKL

**Figure 38 B.** Comparing the level of gene expression of *TNFSF11* in the biological material in patients with chronic otitis media with a retraction pocket of the tympanic membrane at various degrees of its advancement ( $p < 0.05$ ) on the protein RANKL level

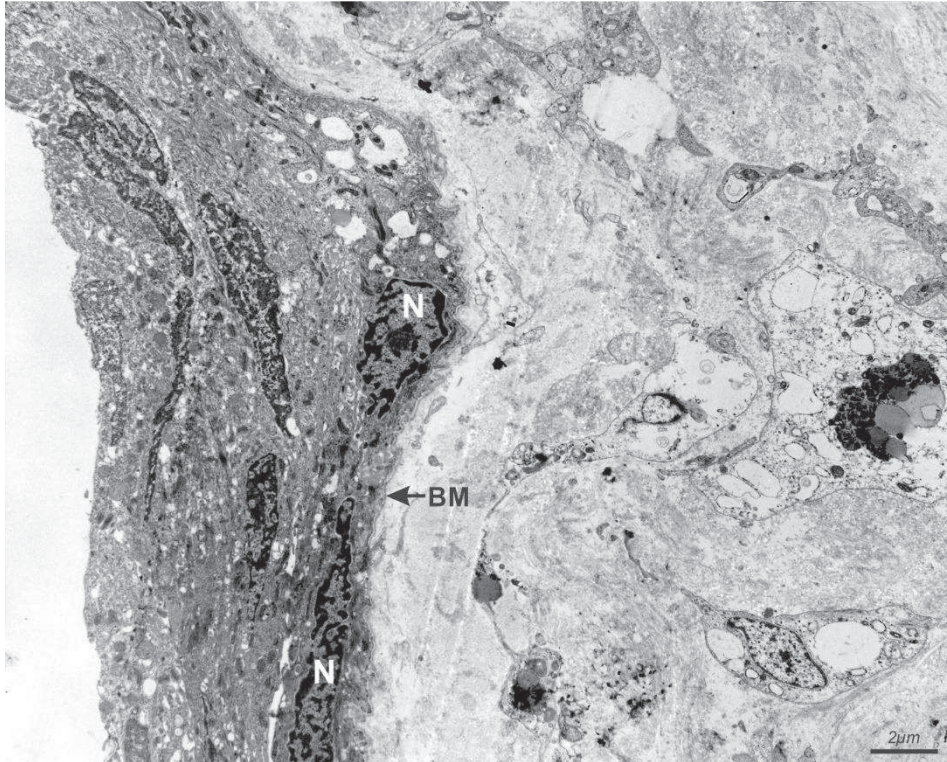
#### 4.6 Wyniki badań transmisyjnej mikroskopii elektronowej

Materiał biologiczny (w postaci kieszonki retrakcyjnej) uzyskany śródoperacyjnie z fragmentów błony bębenkowej oceniano w mikroskopie świetlnym i transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM). Dokonano wnikliwej analizy ultrastruktury badanego materiału, mając świadomość, że trudno będzie odnieść się do nader skąpych danych dotyczących ultrastruktury w piśmiennictwie naukowym [1, 68, 72, 143].

Materiał pobrany został od 10 pacjentów. Każdorazowo poddawany był procedurze utrwalania, odwadniania a i kontrastowania wg. opisu zamieszczonego w rozdziale „Materiał i metody”.

Ogółem wykonano ponad 130 bloczków eponowych z zatopionym materiałem przeznaczonym do analizy. Następnie po obróbce mechanicznej z każdego bloczka sporządzono preparaty półcienkie, które po barwieniu oceniano w mikroskopie świetlnym. Szczegółowa analiza histologiczna pozwoliła na wyodrębnienie i wskazanie mikroskopijnych fragmentów preparatu do badania ultrastruktury. Kolejnym etapem było wykonanie skrawków ultracienkich i umieszczenie ich na siatkach miedzianych (400 oczek na siatce) wcześniej pokrytych membraną wykonaną z formvaru. Łącznie sporządzono ponad 500 preparatów ultracienkich i po dobarwieniu ich solami metali ciężkich analizowano obrazy w mikroskopie elektronowym.

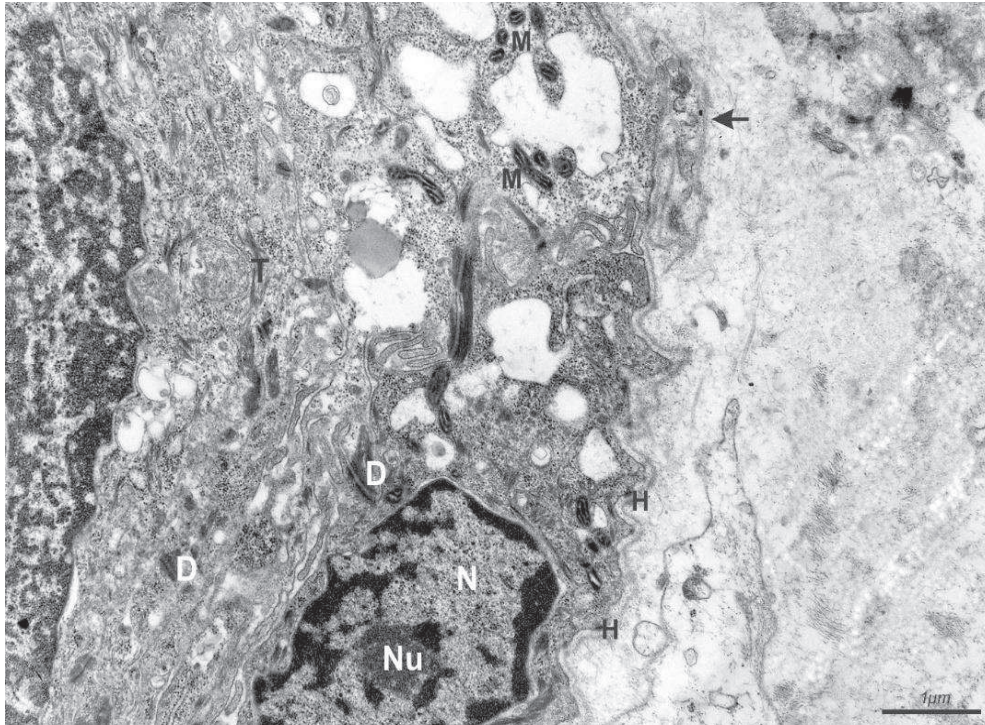
Wyniki obserwacji dokumentowano wykonując elekronogramy na kliszach, które następnie poddane zostały obróbce fotograficznej. Zgromadzenie ponad 600 obrazów pozwoliło na wielokrotną, konsekwentną ocenę materiału, porównywanie otrzymanych wyników i formułowanie wniosków.



**Rycina 39.** Ultrastruktura kieszonki retrakcyjnej. Widoczny zewnętrzny nabłonek (ang. *stratified squamous epithelium*) i położona pod nim tkanka łączna błony właściwej (*lamina propria*). Warstwa rogowa nabłonka odpadła w trakcie preparatyki. Obserwujemy wydłużone ciała keratynocytów, o nietypowym układzie. Uwagę zwraca wyraźne wpuklenie się nabłonka w luźną tkankę błony właściwej. Jądro komórkowe (N), błona podstawna (BM)

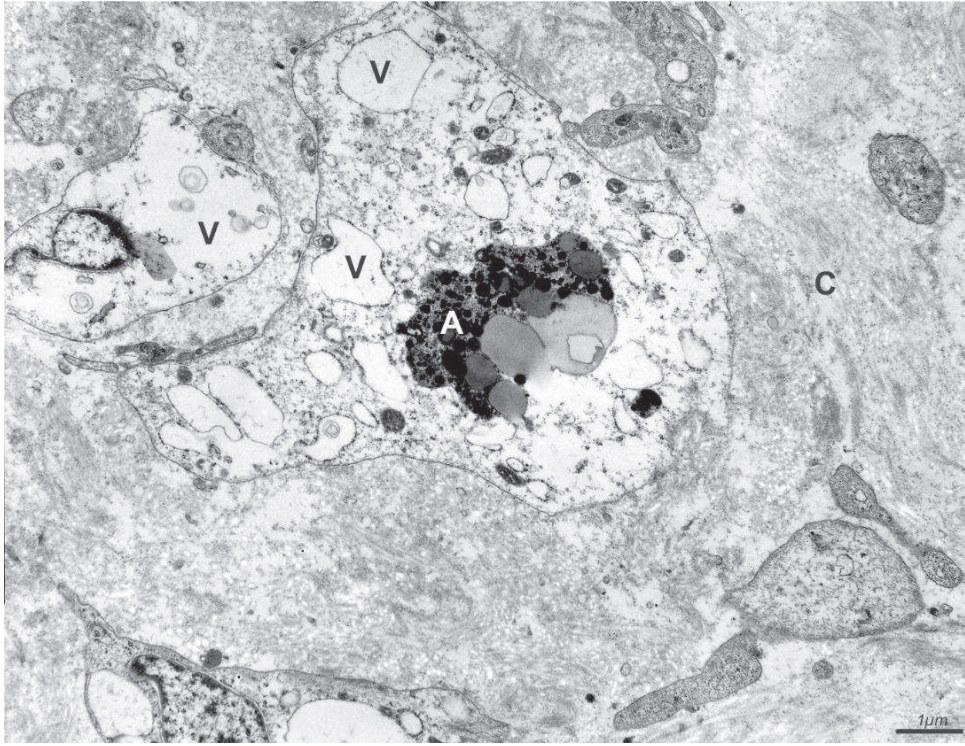
**Figure 39.** Ultrastructure of the retraction pockets. The stratified squamous epithelium and situated under him the connective tissue of lamina propria are visible. The stratum corneum epithelium dropped out in the during preparation. We observe the elongated body keratinocytes and their unusual arrangement. Attention is given by clearly invagination of the epithelium in a loose tissue of lamina propria. The nucleus (N), basement membrane (BM)





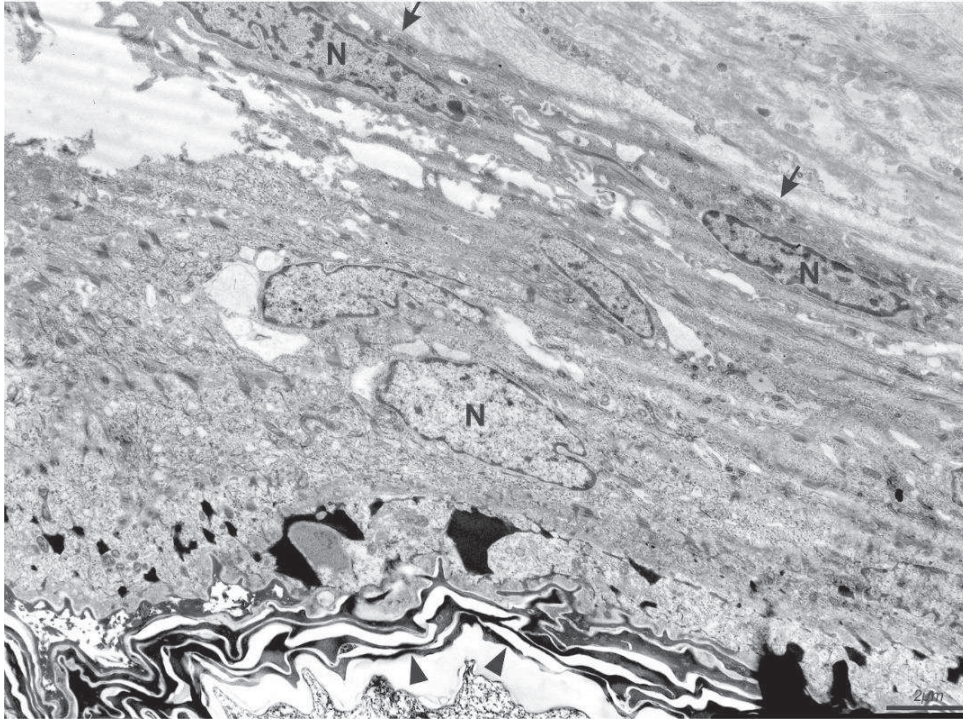
**Rycina 40.** Duże powiększenie mikroskopu elektronowego uwidacznia charakterystyczne cechy fenotypu keratynocytów: tonofilamenty (T), desmosomy (D) i hemidesmosomy (H). W błonie podstawnej (basement membrane) wyróżnić można dwie warstwy (*lamina densa* i *lamina lucida*). Strzałka wskazuje fragment błony podstawnej o zaburzonej ciągłości i zmienionej budowie. Jądro komórkowe (N), jąderko (Nu), mitochondria (M)

**Figure 40.** The electron microscope high magnification demonstrates the constitution keratinocytes: tonofilaments (T), desmosomes (D) and hemidesmosomes (H). The basement membrane can distinguish two layers: *lamina densa* and *lamina lucida*. The arrow indicated fragment of the basal membrane with disturbed continuity and revised construction. The nucleus (N), nucleolus (Nu), mitochondria (M)



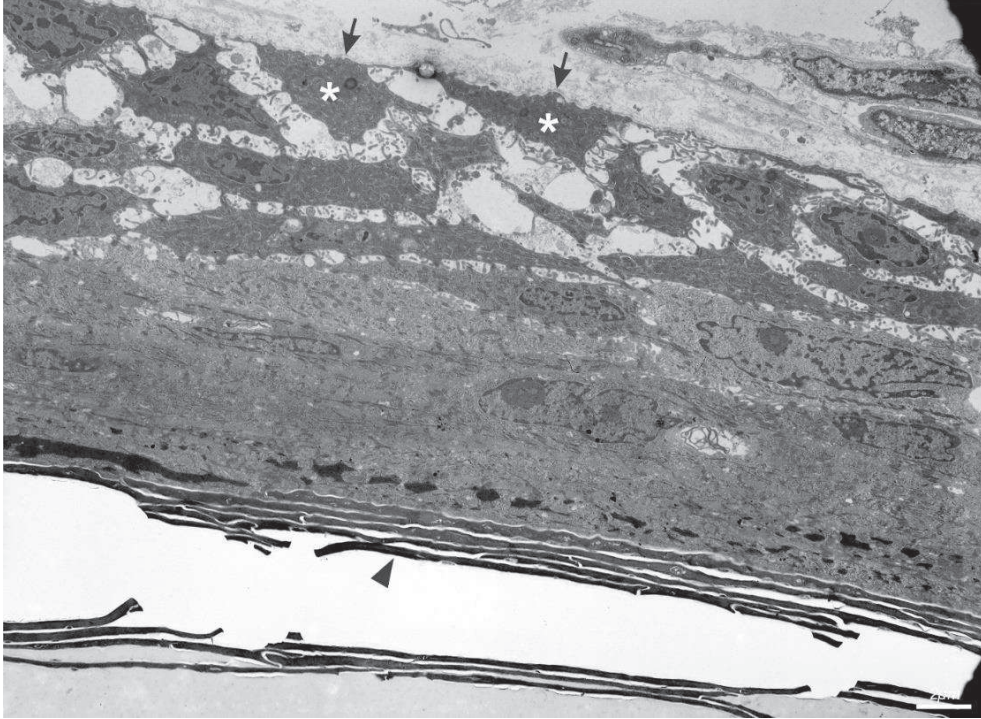
**Rycina 41.** Ultrastrukturalne cechy degradacji elementów komórkowych na terenie tkanki łącznej wskazują na zaawansowany proces autofagii. Liczne obłonione wakuole zawierają strawiony częściowo materiał o różnej przezierności elektronicznej. W przestrzeniach między komórkami fibr blastów widoczne są elementy włókniste istoty międzykomórkowej. Wakuole (V), autofagosom (A), włókna kolagenowe (C)

**Figure 41.** Ultrastructural features of cellular elements degradation in the connective tissue indicate an advanced process of autophagy. Numerous vacuole contain partially digested material of different electron translucency. In the spaces between cells, fibroblasts are visible elements of the fibrous intercellular substance. Vacuole (V) autophagosome (A), collagen fibrils (C)



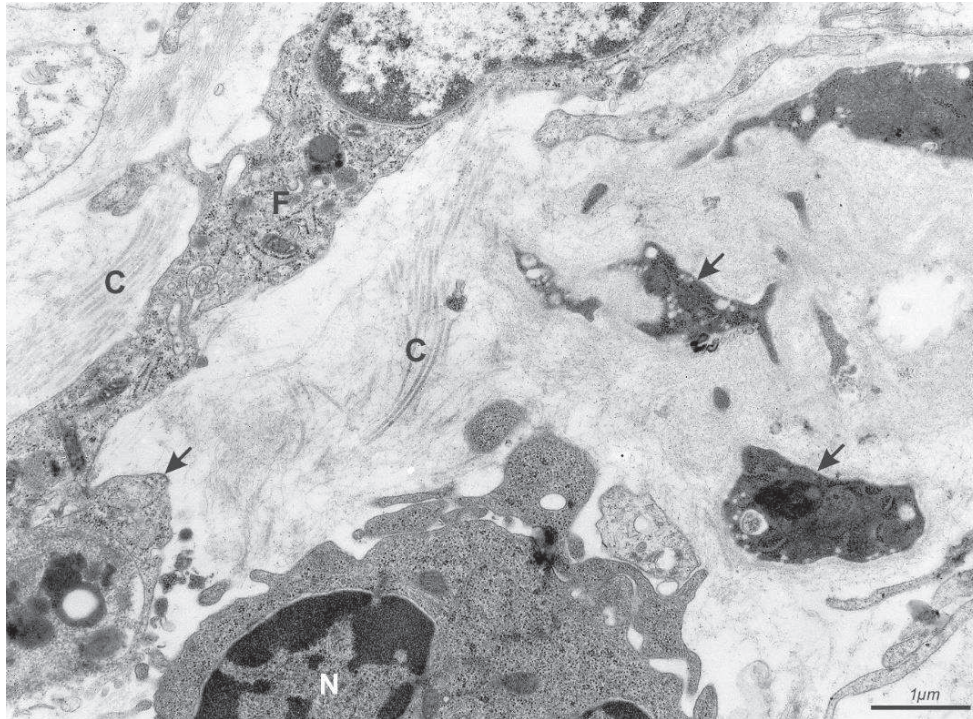
**Rycina 42.** Warstwa naskórkowa kieszonki retrakcyjnej w obrazie mikroskopu elektronowego. Wyraźnie wydłużone ciała keratynocytów zorientowane są równoległe do błony podstawnej ( $\uparrow$ ), która występuje fragmentarycznie. Uwagę zwraca intensywna keratynizacja nabłonka. Jądro komórkowe (N), warstwa zrogowaciała nabłonka ( $\Delta$ )

**Figure 42.** Epidermal layer of the retraction pockets in the image electron microscope. Clearly elongated body keratinocytes are oriented parallel to the basement membrane ( $\uparrow$ ), which here is fragmentary. Attention is given intense keratinization of the epithelium. The nucleus (N), the cornified layer of the epithelium ( $\Delta$ )



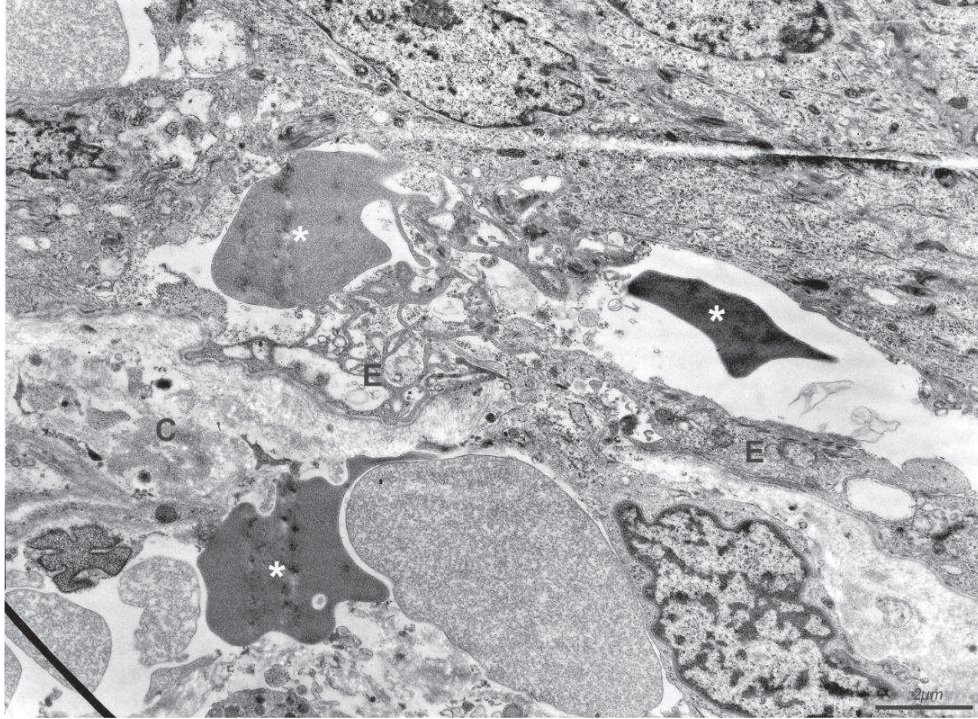
**Rycina 43.** Nabłonek zewnętrzny błony bębenkowej z dobrze zachowaną strukturą budujących go komórek. Komórki bazalne (\*) położone na błonie podstawnej o zachowanej ciągłości (Δ). Nabłonek zrogowaciały (↑)

**Figure 43.** The outer epithelium of the eardrum with well-preserved building structure of the cells. Basal cells (\*) are located on the basal membrane with preserved continuity (Δ). Cornified epithelium (↑)

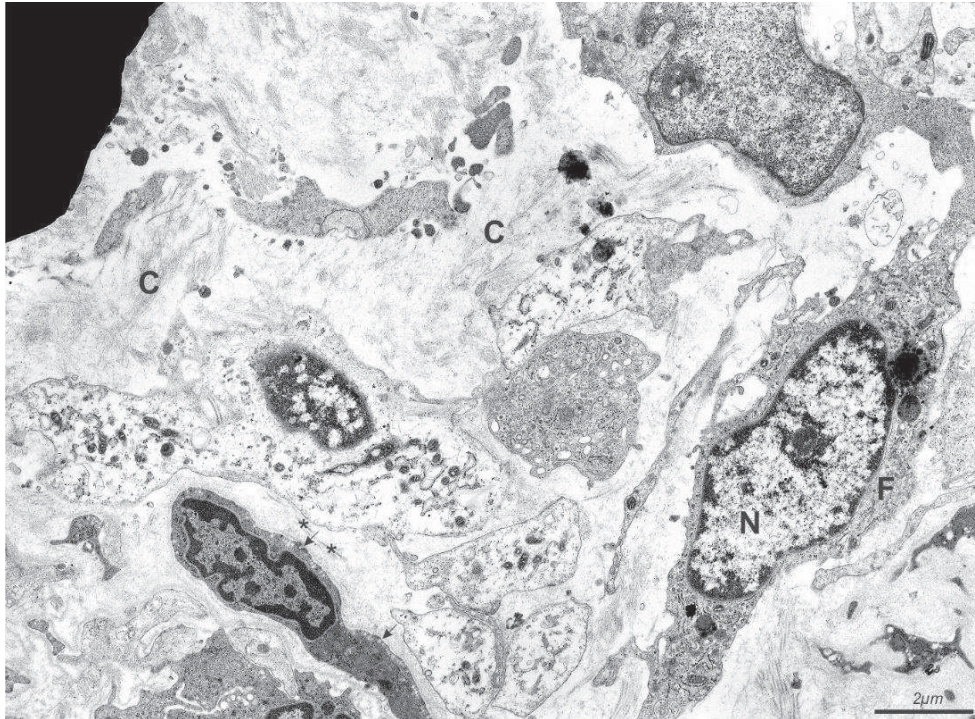


**Rycina 44.** Ultrastruktura tkanki łącznej położonej pod nabłonkiem zewnętrznym. Widoczny fragment fibroblasty (F) z dobrze zachowanymi organellami komórkowymi a także przekroje komórek (↑) w różnych stadiach degradacji. Naciekanie elementami krwi (\* jądro leukocytu) znamionuje obecność procesu zapalnego. Włókna kolagenowe (C)

**Figure 44.** The ultrastructure of the connective tissue under the outer epithelium layer. The fragment fibroblasts (F) with a well preserved cellular organelles and the cross-sections of cells (↑) in different stages of degradation are visible. Infiltration of blood elements (white blood cell nucleus\*) marks the presence of inflammation. Collagen fibers (C)

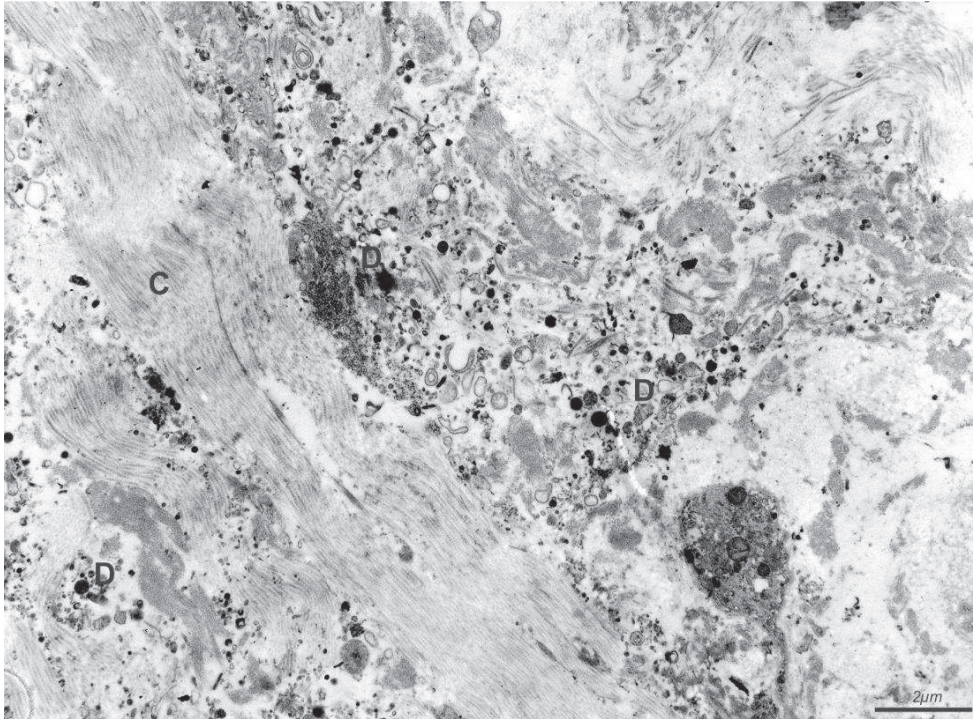


**Rycina 45.** Cechy zapalenia krwotocznego w obrazie mikroskopu elektronowego. W polu widzenia obecne wynaczynione erytrocyty (\*). Komórki śródbłonna (E) naczyń włosowatych mają wyraźne cechy degeneracji. Włókna kolagenowe (C)  
**Figure 45.** Haemorrhagic inflammatory features in the electron microscope image. In the field of view presented extravasated red blood cells(\*). Endothelial cells (E) capillaries have distinct characteristics degeneration. Colla gen fibers (C)



**Rycina 46.** Cechy ultrastrukturalne zmian martwicowych komórek tkanki łącznej kieszonki retrakcyjnej. Jądro komórki fibroblastycznej (N). Liczne pęcherzyki pinocytarne fibroblasta (↑). Nowotworzone włókna kolagenowe (\*), włókna kolagenowe o różnym stopniu degradacji (C)

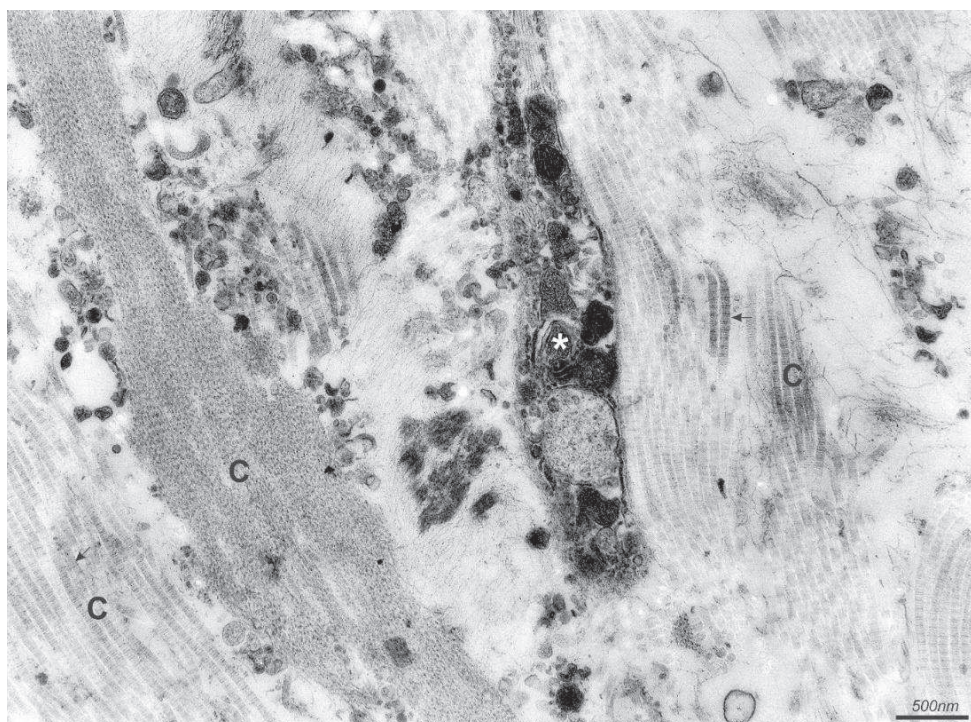
**Figure 46.** The ultrastructural features of a necrotic changes of the connective tissue in retraction pockets. Fibroblastic cell nucleus (N). Numerous pinocytotic vesicles of fibroblast (↑). Newly created collagen fibers (\*), the collagen fibers of different degradation level (C)



**Rycina 47.** Uformowanie i układ włókien kolagenowych (C) wskazuje na zaawansowany proces degeneracyjny w warstwie okrężnej błony właściwej (*lamina propria*) w obszarze kieszonki retrakcyjnej. W centrum pola widzenia liczne elementy rozpadu komórek (*cellular debris*) (D)

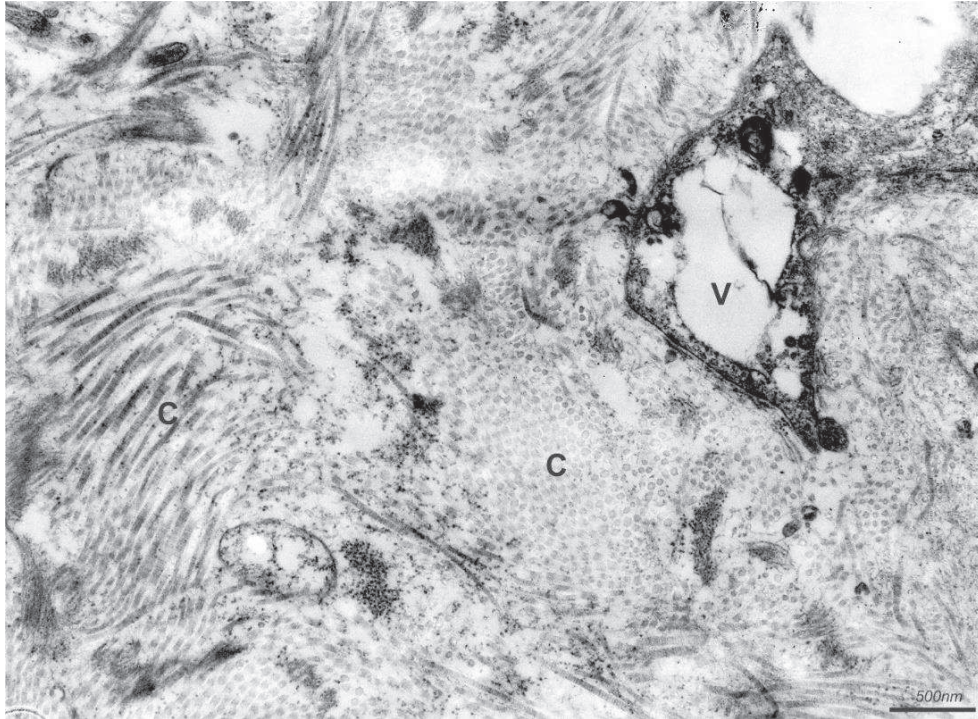
**Figure 47.** The formation and arrangement of collagen fibers (C) are indicated to advanced degenerative process in a circular layer of lamina propria of the retraction pockets. In the center of the field of view are a plurality elements of cell lysis (*cellular debris*) (D)





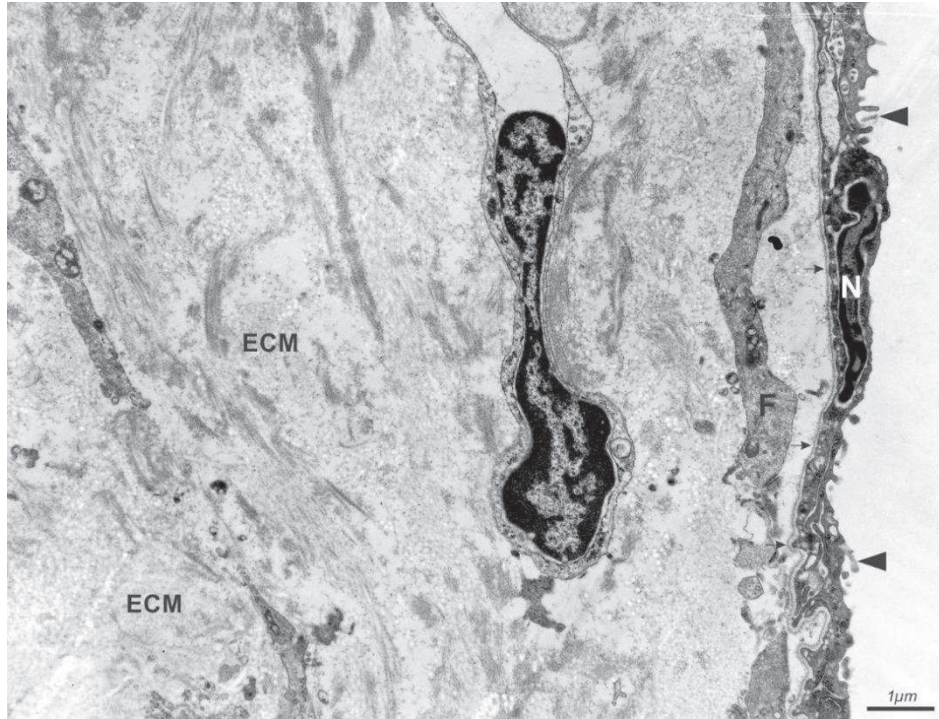
**Rycina 48.** Ultrastruktura włókien kolagenowych kieszonki retrakcyjnej (C). Odpowiednie powiększenie mikroskopowe pozwala obserwować charakterystyczne prążkowanie włókien (↑). W centrum obrazu fragment komórki z wyraźnymi cechami martwicy (\*)

**Figure 48.** The ultrastructure of the collagen fibers in retraction pocket (C). The microscope magnification can observe the characteristic Striations fiber (↑). In the center of the image is visible a fragment the cells with distinct features of necrosis (\*)



**Rycina 49.** Beładny układ włókien kolagenowych pod dużym powiększeniem mikroskopu elektronowego. Widoczne są włókna w przekroju podłużnym i skośnym (C). Komórka w prawej części preparatu posiada takie cechy martwicy jak wakuolizacja cytoplazmy (V) i degradacja struktur błonistych

**Figure 49.** Chaotic arrangement of collagen fibers under high magnification electron microscope. Fibers are visible in longitudinal and oblique section (C). Cell in the right part of the preparation has the features of necrosis: vacuolisation of the cytoplasm (V) and degradation of membranous structures



**Rycina 50.** Błona śluzowa kieszonki retrakcyjnej z nabłonkiem jednowarstwowym płaskim w obrazie mikroskopu elektronowego. Nabłonek w wykształconymi mikrokosmkami ( $\Delta$ ) położony jest na dobrze zachowanej błonie podstawnej ( $\dagger$ ). W tkance łącznej obecne fibroblasty (F) oraz elementy włókniste istoty międzykomórkowej (*extracellular matrix*, ECM). Jądro komórki nabłonka (N)

**Figure 50.** The mucosa of retraction pocket with simple squamous epithelium in the image electron microscope. The epithelium with developed microvillies ( $\Delta$ ) is located in the well-preserved basal membrane ( $\dagger$ ). The fibroblasts (F) and fibrous elements of extracellular matrix are present at the connective tissue. Nucleus of epithelial cells (N)

## 5. OMÓWIENIE

Badania przeprowadzono w grupie chorych dorosłych w wieku 18-45 lat, ponieważ u dzieci rozwój kieszonek jest często bardziej dynamiczny i występują inne czynniki mające wpływ na ich rozwój. Ponadto ten podział wiekowy wybrano ze względu na to, że u dzieci w pierwszym etapie rozwoju KR często stosuje się leczenie zachowawcze (stosowanie różnych przyrządów napowietrzających jamę bębenkową oraz niektórych leków). Poza tym u dzieci często wykonywane zabiegi wycięcia migdałków podniebiennych i gardłowego, które są jedynym z głównych czynników predysponujących powstanie ujemnego ciśnienia w jamie bębenkowej i rozwoju KR [132, 149].

Wśród objawów otologicznych u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z KR stwierdzono niedosłuch różnego stopnia, który stanowił główny kryterium włączenia. Badana grupa składała się z pacjentów z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną z niedosłuchem, którzy wymagali operacji poprawiającej słuch. Poza niedosłuchem, szumy uszne, okresowe zawroty głowy i wyciek z ucha były najczęściej występującymi objawami klinicznymi. Z tego wynika, że przewlekłe zapalenie ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną nie ma specyficznych objawów klinicznych, które by pozwoliły różnicować tę formę zapalenia od innych. Podobne dane znaleźć można w piśmiennictwie [142, 149].

Szumy uszne występowały najczęściej u pacjentów z niedosłuchem mieszanym umiarkowanego i średniego stopnia, co może wynikać z selektywności wyboru pacjentów włączonych do badania. Do badanej grupy kwalifikowano pacjentów głównie w zaawansowanych stadiach przewlekłego zapalenia ucha środkowego z KR. Mechanizm powstawania szumów usznych w przebiegu zaburzenia wentylacji ucha środkowego nie został dotychczas poznany. Nie można wykluczyć działania toksycznego na ucho wewnętrzne czynników molekularnych, odpowiedzialnych za podtrzymywanie procesu zapalnego w patologicznie zmienionej błonie śluzowej ucha środkowego. Wyciek z ucha obserwowano najczęściej u pacjentów z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką w późnym (III i IV) stadium zaawansowania, co potwierdzają inni badacze [130, 142]. Można przypuszczać, że szumy uszne i wyciek z ucha mogą świadczyć o zaawansowaniu procesu zapalnego w przewlekłym zapaleniu ucha środkowego z KR.

Wykazano dodatnią, znamiennej statystycznie korelację między obecnością zawrotów głowy a wiekiem, typem i poziomem niedosłuchu. Napady zawrotów głowy występowały u pacjentów w III i IV dekadzie życia, u których rozpoznano niedosłuch mieszany w umiarkowanym i średnim stopniu nasilenia.

Trudności interpretacji przez pacjentów różnicy pomiędzy zaburzeniami równowagi a zawrotami głowy spowodowały, że do zawrotów głowy kwalifikowaliśmy wszelkiego rodzaju zaburzenia równowagi, zarówno układowe jak i nieukładowe.

Przyczyna powstawania zawrotów głowy w przebiegu przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną również nie została do końca wyjaśniona.

Można jedynie przypuszczać, że zaburzenia wentylacyjne ucha środkowego leżą u podłoża występowania zawrotów głowy. W kieszonce retrakcyjnej występuje permanentnie ujemne ciśnienie, które łatwiej doprowadza do wystąpienia zawrotów głowy. Idąc tym tropem myślenia, przez analogię z próbą przetokową z balonem Politzera, podczas dekompresji zawrót głowy jest silniejszy [9, 26, 37, 149].

Perforację w części wiotkiej błony bębenkowej stwierdzono tylko u 1, a w części napiętej u 5 chorych. Zaobserwowano, że perforacja BB najczęściej występuje w zaawansowanym stadium rozwoju KR (III° i IV° wg. Tosa). Obserwacje KR u dzieci wykazały, że w tych przypadkach do perforacji BB dochodzi częściej [8, 22, 34, 133]. Jak wytłumaczyć to zjawisko? Obserwacje kliniczne wskazują, że BB u dzieci jest słabsza, podatność jej jest mniejsza a mechanizm samooczyszczania nie jest w pełni ukształtowany. Ponadto należy pamiętać, że przede wszystkim dzieci chorują na wysiękowe zapalenie ucha środkowego, które jest najważniejszą przyczyną powstania atelektazji lub KR. Rozwój atelektazji w uchu z wysiękowym zapaleniem jest bardzo częste. U dzieci tych obserwuje się nierzadko okresy zaostrzenia, któremu towarzyszy często samoistna perforacja. Zakażenie ucha doprowadza, to łatwego niszczenia osłabionej BB, co w konsekwencji prowadzi do powstania stałej perforacji.

W grupie badanych chorych nie wykazano wskaźników stanu zapalnego (OB, CRP, leukocyty).

Czas od wystąpienia pierwszych objawów choroby (najczęściej niedosłuchu) do podjęcia leczenia operacyjnego wynosił średnio 5,4 lat. Czas trwania choroby nie różnił się w istotny sposób pomiędzy grupą badanych kobiet a mężczyzn (kobiety - 4,9 lat; mężczyźni - 5,6 lat).

W badaniu otoskopowym przy użyciu mikroskopu operacyjnego wykazano KR w części wiotkiej błony bębenkowej u 10 chorych a w części napiętej – u 25. Według danych wielu autorów, kieszonki retrakcyjne lokalizują się najczęściej w części wiotkiej [152, 155]. Maw i wsp. na podstawie obserwacji dzieci z nawracającym wysiękowym zapaleniem ucha środkowego (w okresie 12 lat) ustalili, że częstość występowania KR w części wiotkiej BB wynosi 40%, w części napiętej – 17% [96]. Na podstawie uzyskanych danych można założyć, że różnica między naszymi wynikami a danymi z piśmiennictwa może wynikać z tego, że KR w części wiotkiej błony bębenkowej łatwiej poddają się leczeniu zachowawczemu lub jest możliwe zatrzymanie jej rozwoju za pomocą małoinwazyjnych metod leczenia (założenie dreników wentylacyjnych). Uzyskane przez nas dane zbliżone do opisywanych przez Arsa i wsp., którzy stwierdzili, iż KR występują w 40% w części wiotkiej, a w 60% w części napiętej, w tym 36% przypadków - w kwadrancie tylnogórnym BB [8].

Kieszonkę retrakcyjną części wiotkiej (wg klasyfikacji Tosa) II° stwierdzono u 1 pacjenta, III° – u 7, a IV° – u 2.

Kieszonkę retrakcyjną w części napiętej błony bębenkowej (wg klasyfikacji Sade) II° stwierdzono u 5 pacjentów, III° – u 7, IV° – u 13.

Nie obserwowano chorych z kieszonką retrakcyjną BB w I stadium rozwoju, co może wynikać z braku dolegliwości (ból, niedosłuch) ze strony ucha.

Należy pamiętać, że często spotyka się przypadki chorych, u których rozwój kieszonek retrakcyjnych jest bezobjawowy. Z tego powodu chorzy zgłaszają się do lekarza w późnym stadium rozwoju KR, kiedy dominuje niedosłuch.

Analizując wyniki badań audiometrycznych wykazano, że niedosłuch przewodzeniowy występował u 22 chorych, a niedosłuch mieszany u 13-tu. Rozwój atelektazji lub kieszonki retrakcyjnej prowadzi do uszkodzenia aparatu układu przewodzącego dźwięk [120, 123]. Przewaga chorych z niedosłuchem przewodzeniowym w grupie badanej może wynikać z wykluczenia z grupy badawczej chorych w wieku powyżej 45 lat, u których częściej występuje komponent odbiorczy niedosłuchu (urazy akustyczne, uszkodzenia toksyczne ucha wewnętrznego, itp.). Średni poziom niedosłuchu u chorych z niedosłuchem przewodzeniowym wynosił 40 dB, u chorych z niedosłuchem mieszanym – 59 dB; natomiast średni poziom niedosłuchu w całej grupie badanej wynosił 47 dB. Opisywane w piśmiennictwie średnie wartości niedosłuchu u pacjentów z przewlekłym zapaleniem z KR mieszczą się w przedziale od 15 do 45 dB [5, 30, 72, 122]. Jednakże trudno porównywać dane z piśmiennictwa do wartości z grupy badanej, która składała się z wyselekcjonowanych pacjentów, u których KR towarzyszył znaczny niedosłuch, będący wskazaniem do operacji. Wykazano dodatnią, statystycznie istotną korelację między poziomem niedosłuchu a wiekiem pacjentów, typem niedosłuchu, występowaniem szumów usznych oraz zawrotów głowy. Okazało się, że im starszy pacjent tym głębszy był poziom niedosłuch oraz większa wartość komponentu odbiorczego (w przypadku niedosłuchu mieszanego).

Większy poziom niedosłuchu obserwowano u chorych z czynnym stanem zapalnym: ziarnina w uchu środkowym i zewnętrznym, wyciekami z ucha oraz z zawrotami głowy. Częstotliwość występowania zawrotów głowy i szumów usznych u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z KR, szczególnie w jej zaawansowanym stadium, może przemawiać za toksycznym działaniem mediatorów zapalnych na ucho wewnętrzne.

Średnia rezerwa ślimakowa dla ucha z kieszonką retrakcyjną wahała się w przedziale od 20 dB do 45 dB, a średnia dla całej grupy wynosiła 21,3 dB przed operacją, co potwierdzają dane z piśmiennictwa [26, 31, 37].

Wykonano analizę danych audiologicznych, tj. głębokości i typu niedosłuchu z uwzględnieniem zmiennych cech demograficznych i klinicznych przewlekłego zapalenia ucha środkowego (wiek pacjentów, płeć, typ kieszonki retrakcyjnej oraz stopień jej zaawansowania, występowanie wycieków z ucha, szumów usznych, zawrotów głowy, perforacja BB i obecność ziarniny).

Wykazano pozytywny, statystycznie istotny związek między typem niedosłuchu a wiekiem pacjenta, poziomem niedosłuchu, obecnością szumów usznych oraz występowaniem zawrotów głowy.

Na podstawie danych piśmienniczych można stwierdzić, że kluczową rolę w rozwoju przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną lub atelektazją odgrywa proces zapalny górnych dróg oddechowych, doprowadzający do zaburzenia wentylacji ucha środkowego [15, 59, 69, 102, 125, 154].

Aktywność miejscowej reakcji zapalnej warunkuje początek choroby oraz jej dalszy przebieg. W badaniach nad etiopatogenezą powstania i ewolucji KR błony

bębenkowej można wyróżnić mechanizm zewnętrzny i wewnętrzny [22, 23, 69]. Wewnętrzny uwarunkowany jest działaniem enzymów proteolitycznych i cytokin znajdujących się w wysięku zapalnym. Enzymy proteolityczne występujące w zmienionym zapalnie nabłonku odpowiadają za mechanizm zewnętrzny (cyt. wg [69]). Lizozym, hydrolazy oraz cytokiny prozapalne występujące w warstwie zewnętrznej BB mogą powodować destrukcję nie tylko włókien kolagenowych warstwy środkowej błony bębenkowej, ale również w sąsiadującej tkance kostnej (boczna ściana nadbębenka, kosteczki słuchowe). Istnieje jednak system enzymów o działaniu antagonistycznym, co zapewnia równowagę i zapobiega destrukcji wszystkich warstw błony bębenkowej i tkanki kostnej oraz dalszemu rozwojowi kieszonki retrakcyjnej. W warunkach patologicznych ta równowaga łatwo ulega zaburzeniu. W świetle obecnych doniesień na temat etiopatogenezy przewlekłego zapalenia ucha środkowego z KR, cytokiny wydają się być kluczowymi modyfikatorami rozwoju choroby.

W grupie badanej i kontrolnej określono poziom ekspresji genu *IL-1 $\alpha$* , *IL-6*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$* , *MMP-9* oraz *TNFSF11* na poziomie mRNA za pomocą metody RT-PCR w czasie rzeczywistym. Wyniki przedstawiono jako względny poziom ekspresji badanego genu w stosunku do poziomu ekspresji genu referencyjnego.

Za pomocą komercyjnie dostępnych testów ELISA określono stężenie białka dla *IL-1 $\alpha$* , *IL-6*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$* , *MMP-9* oraz RANKL w materiale biologicznym pobranym od pacjentów z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z KR oraz w grupie kontrolnej. W przeprowadzonych badaniach u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z KR wykazano istotną różnicę wzrostu poziomu mRNA dla genu *IL-1 $\alpha$*  (x20,69) w porównaniu z grupą kontrolną. W grupie badanej stężenie *IL-1 $\alpha$*  było znacznie wyższe (x7,5) niż w materiale biologicznym pobranym ze zwłok. Ekspresja genu jest procesem wieloetapowym, ściśle regulowanym na wielu poziomach. Najczęściej wzrost lub spadek poziomu mRNA dla danego genu skutkuje wzrostem lub spadkiem poziomu białka.

Niekiedy w procesach patologicznych, na przykład w procesie nowotworowym, nie obserwuje się jednak dodatniej korelacji między poziomem mRNA a ilością białka danego genu [109]. Dlatego też sprawdzono stopień zależności poziomu mRNA dla *IL-1 $\alpha$*  od ilości białka *IL-1 $\alpha$*  zarówno w całej analizowanej populacji ( $R=0,87$ ) jak i w poszczególnych jej grupach: badana ( $R=0,5$ ) i kontrolna ( $R=0,55$ ). Z uzyskanych danych wynika, że istnieje statystycznie istotna zależność między poziomem mRNA dla *IL-1 $\alpha$*  a stężeniem kodowanego przez ten gen białka.

Wzrost poziomu prozapalnej *IL-1 $\alpha$*  w grupie badanej świadczy o znaczeniu tej cytokiny w procesie rozwoju kieszonki retrakcyjnej oraz potwierdza rolę stanu zapalnego w rozwoju KR w przewlekłym zapaleniu ucha środkowego.

W badaniach histologicznych materiału, pobranego z kieszonki retrakcyjnej, wykazano obecność makrofagów, neutrofilów oraz komórek nabłonkowych, które w stanie pobudzenia i wzmożonej aktywności produkują *IL-1* [121, 128, 137].

W wyniku analizy danych piśmienniczych nie znaleziono prac określających poziom ekspresji genu *IL-1 $\alpha$*  metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym oraz stężenie *IL-1 $\alpha$*  za pomocą komercyjnie dostępnych testów ELISA w materiale biologicznym z kieszonki retrakcyjnej u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego.

Nie zaobserwowano istotnej statystycznie korelacji między ekspresją genu *IL-1 $\alpha$*  na poziomie mRNA i jego produktu białkowego a stopniem zaawansowania KR w części wiotkiej błony bębenkowej.

Wynika to najprawdopodobniej ze zbyt małej liczebności grupy (n=10). Dlatego nie rozdzielamy grupy badanej na podgrupy z KR części wiotkiej (n=10) i KR części napiętej (n=25) błony bębenkowej. Analiza statystyczna i poszukiwanie korelacji między poziomem ekspresji badanych genów a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi wykonano w całej grupie badanych pacjentów.

Dokonano analizy statystycznej w celu wykazania korelacji między poziomem ekspresji genu *IL-1 $\alpha$*  a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi. Wyniki badań pokazują istotną statystycznie chociaż słabo dodatnią korelację między poziomem ekspresji genu *IL-1 $\alpha$*  na poziomie mRNA a stopniem zaawansowania KR, perforacją błony bębenkowej, obecnością ziarniny w przewodzie słuchowym i w jamie bębenkowej oraz wyciekami z ucha. Analiza uzyskanych danych nie wykazała związku między stężeniem białka IL-1 $\alpha$  a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi.

Wyniki badań pokazują istotną statystycznie ale słabo dodatnią korelację między poziomem ekspresji genu *IL-1 $\alpha$*  na poziomie mRNA a stopniem zaawansowania KR, perforacją błony bębenkowej, obecnością ziarniny oraz wyciekami z ucha. Zaobserwowano wzrost ekspresji genu *IL-1 $\alpha$*  wraz ze stopniem zaawansowania KR. Najwyższy poziom mRNA i stężenia białka dla IL-1 $\alpha$  stwierdzono w IV<sup>o</sup> zaawansowania KR. To przemawia za tym, że przewlekłe zapalenie ucha środkowego z KR jest chorobą aktywną a nie pozostałością przebytego procesu zapalnego, a także za istotną rolę IL-1 $\alpha$  we wszystkich stadiach rozwoju KR. Wyższy poziom ekspresji genu *IL-1 $\alpha$*  w przypadku najbardziej zaawansowanego stadium rozwoju KR potwierdza kluczową rolę tej interleukiny w późnych stadiach choroby.

Jedną z najważniejszych i najbardziej wielokierunkowo działających cytokin jest IL-6. Produkowana przez makrofagi i monocyty, w nieznacznej ilości wydzielana jest również przez fibroblasty, keratynocyty, osteoblasty, komórki mięśni gładkich naczyń, chondrocyty oraz limfocyty T i B. Produkcja interleukiny-6 stymulowana jest przez interferon (IF), czynnik martwicy nowotworu (TNF), interleukinę-1, lipopolisacharydy oraz wirusy. IL-6 współuczestniczy w odpowiedzi zapalnej organizmu [44, 61, 75, 109, 110, 151]. Ponadto, osteoblasty wydzielają IL-6, czym stymulują tworzenie osteoklastów [25, 78]. Ten fakt oraz uzyskane w wyniku naszego badania dane pozwalają przypuszczać, że IL-6 odgrywa bardzo ważną rolę w procesie destrukcji kości w późnych stadiach zaawansowania kieszonki retrakcyjnej.

W grupie badanej określono poziom ekspresji genu *IL-6* w stosunku do genu referencyjnego  $\beta$ -aktyny (ACTB) za pomocą metody RT-PCR w czasie rzeczywistym. Wartość średnia poziomu mRNA dla IL-6 była znacznie wyższa (x10,88) niż w materiale biologicznym pobranym ze zwłok. Za pomocą testu ELISA określono stężenie IL-6 w grupie badanej, które było znacznie wyższe (x20,02) niż w materiale ze zwłok. Wykazano statystycznie istotną różnicę poziomu ekspresji genu *IL-6* w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej, co świadczy o znaczeniu tej prozapalnej cytokiny w etiologii i patogenezie powstania i rozwoju przewlekłego zapa-



lenia ucha środkowego z KR i potwierdza podłoże zapalne w rozwoju tej jednostki chorobowej.

W analizowanym piśmiennictwie nie znaleziono prac określających poziom ekspresji genu *IL-6* metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym oraz stężenie IL-6 za pomocą komercyjnie dostępnych testów ELISA w materiale biologicznym z kieszonki retrakcyjnej u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego.

Ekspresja genu jest procesem wieloetapowym, ściśle regulowanym na wielu poziomach. Dlatego sprawdzono stopień zależności poziomu mRNA dla *IL-6* od ilości białka zarówno w całej analizowanej populacji jak i w poszczególnych jej grupach (badana, kontrolna). Analiza statystyczna otrzymanych wyników pokazała, że istnieje znamienne statystycznie związki między poziomem mRNA danego genu a jego produktem białkowym w całej badanej populacji, ale dla *IL-6* to był najslabszy związki ( $R=0,29$ ) między mRNA a jego produktem białkowym wśród wszystkich badanych cytokin.

Ponadto dokonano porównania między poziomami mRNA dla *IL-6* a poziomem jego białka w grupie badanej i kontrolnej. W przypadku ekspresji genów *IL-6* stopień korelacji znacznie różni się w obu grupach. W przypadku ekspresji genu *IL-6* zaobserwowano słabą korelację w grupie badanej ( $R= -0,15$ ) i grupie kontrolnej ( $R=0,14$ ). Ciekawym spostrzeżeniem jest to, że w grupie badanej ten związki jest ujemny, a w grupie kontrolnej – dodatni. Zaobserwowane różnice w ekspresji genu *IL-6* między grupą badaną a kontrolną mogą wynikać ze skrócenia czasu półtrwania ( $t_{1/2}$ ) tej cytokiny w niektórych stanach patologicznych [44, 61, 65, 116, 135].

Dokonano analizy statystycznej i określenia zależności między poziomem ekspresji genu *IL-6* a danymi demograficznymi i cechami klinicznymi. Wykazano ujemną znamienne statystycznie korelację między poziomem ekspresji genu *IL-6* a stopniem zaawansowania KR, obecnością perforacji błony bębenkowej, ziarniny oraz szumów usznych i wycieków z ucha. Nie wykazano znamienne statystycznie korelacji poziomu ekspresji genu *IL-6* z innymi danymi demograficznymi i cechami klinicznymi.

W wyniku wykonanej analizy statystycznej wykazano znamienne statystycznie ( $p=0,022$ ) ujemną słabą korelację ( $R= -0,15$ ) między poziomem ekspresji genu *IL-6* a stopniem zaawansowania KR u wszystkich chorych,  $n=35$ . Uzyskane wyniki pokazują bardzo wysoki poziom korelacji ( $R=0,82$ ) między stężeniem IL-6 a stopniem zaawansowania KR. Wykryto związki między stężeniem IL-6 a obecnością perforacji, ziarniny w obrębie przewodu słuchowego zewnętrznego oraz wyciekami z ucha.

Zaobserwowano zmniejszenie poziomu ekspresji genu *IL-6* w stosunku do stopnia zaawansowania kieszonki retrakcyjnej. Najwyższy poziom ekspresji genu *IL-6* stwierdzono w II° zaawansowania KR, który obniżał się wraz z pogłębieniem procesu rozwoju kieszonki. W wyniku analizy uzyskanych danych dotyczących stężenia IL-6 zaobserwowano sytuację przeciwną: stwierdzono wzrost stężenia białka IL-6 wraz ze zwiększeniem stopnia zaawansowania kieszonki. Uzyskane dane świadczą o aktywnej roli IL-6 w rozwoju KR oraz hamującym działaniu białka IL-6 na ekspresję genu *IL-6*.

Interleukina-10 to cytokina przeciwzapalna, która hamuje wytwarzanie cytokin prozapalnych. W większości wytwarzana jest przez monocyty, częściowo przez Th2

limfocyty, mastocyty i pobudzone komórki B i T. Samoistna ekspresja IL-10 jest minimalna i wymaga pobudzenia przez florę patologiczną [27, 28, 49].

W przeprowadzonym badaniu wykazano istotną różnicę wzrostu poziomu mRNA dla genu *IL-10* (x2575) w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie badanej stężenie IL-10 było znacznie wyższe (x16,74) niż w materiale biologicznym pobranym ze zwłok, co potwierdza rolę tej cytokiny w patogenezie rozwoju przewlekłego zapalenia ucha środkowego z KR oraz jest dowodem na to, że KR jest dowodem na to, że KR jest procesem aktywnym, a nie pozostałością przebytej choroby.

Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykonana przy użyciu współczynnika korelacji rang Spearmana wykazała, że istnieje znamienne statystycznie związku między poziomem mRNA dla genu *IL-10* ( $R=0,88$ ) a stężeniem jego białka w całej analizowanej populacji. Analizując poziom ekspresji genu *IL-10* wykryto bardzo wysoki poziom korelacji ( $R=0,75$ ) produktu białkowego w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z KR. W grupie kontrolnej ten związek jest słaby ( $R=0,28$ ), co jeszcze raz potwierdza rolę IL-10 w przebiegu przewlekłego zapalenia ucha środkowego z KR.

Dokonano analizy statystycznej w poszukiwaniu korelacji między poziomem ekspresji genu *IL-10* a danymi demograficznymi i cechami klinicznymi. W wyniku analizy statystycznej wykazano ujemną znamienne statystycznie korelację między poziomem mRNA IL-10 w materiale biologicznym u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z KR a stopniem jej zaawansowania, obecnością perforacji oraz ziarniny. Nie wykazano istotnej korelacji między poziomem ekspresji genu *IL-10* a pozostałymi danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi. Wyniki uzyskanych danych pokazują ujemną przeciętną korelację ( $R= -0,44$ ) między stężeniem IL-10 a stopniem zaawansowania KR ( $n=35$ ) oraz ujemną słabą korelację ( $R= -0,21$ ) z obecnością ziarniny w jamie bębenkowej i/lub przewodzie słuchowym zewnętrznym. Analizując uzyskane wyniki zaobserwowano zwiększenie poziomu ekspresji genu *IL-10* w zaawansowanych kieszonkach retrakcyjnych. Najwyższy poziom ekspresji genu *IL-10* stwierdzono w II° zaawansowania KR, który stopniowo obniżał się wraz z pogłębieniem procesu jej rozwoju.

Uzyskane dane pokazują ujemną przeciętną korelację ( $R= -0,44$ ) między stężeniem IL-10 a stopniem zaawansowania KR ( $n=35$ ) oraz ujemną słabą korelację ( $R= -0,21$ ) z obecnością ziarniny w jamie bębenkowej i/lub przewodzie słuchowym zewnętrznym. Nie wykazano istotnej korelacji z pozostałymi badanymi cechami klinicznymi oraz danymi demograficznymi.

W wyniku analizy uzyskanych danych dotyczących stężenia IL-10 zaobserwowano obniżenie stężenia danego białka w bardziej zaawansowanych stopniach rozwoju KR.

Mechanizm działania IL-10 jest głównie przeciwzapalny, obserwując więc wyższy poziom ekspresji genu *IL-10* w późnych stadiach zaawansowania choroby można przypuścić, że bierze ona udział w patomechanizmie regresji zmian w KR. Uzyskane dane mogą też świadczyć o istotnym przełomie równowagi w procesie przeciwdziałania cytokin pro- i przeciwzapalnych w późnych stadiach rozwoju KR oraz w przypadkach nadkażenia i rozwoju tkanki ziarninowej. W takich sytuacjach do-

chodzi do nieodwracalności zmian patologicznych w sposób samoistny i powstaje predyspozycja do dalszego nasilania się procesu chorobowego.

W wyniku analizy piśmiennictwa nie znaleziono prac określających poziom ekspresji genu *IL-10* metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym oraz stężenie IL-10 za pomocą testów ELISA w materiale biologicznym z kieszonki retrakcyjnej.

Czynnik martwicy nowotworu to cytokina związana z procesem zapalnym. Produkowana jest głównie przez aktywne monocyty i makrofagi oraz w znacznie mniejszych ilościach przez inne tkanki (adipocyty, keratynocyty, fibroblasty, neutrofile, mastocyty oraz niektóre limfocyty). Lipopolisacharydy, IL-1, interferon gamma stymulują produkcję TNF- $\alpha$ . Wytwarzanie tej cytokiny może być pobudzone autokrynnie (tj. przez sam TNF- $\alpha$ ). Jest jedną z głównych cytokin, biorących udział w odpowiedzi zapalnej i immunologicznej [78, 94, 113, 146]. W ostatnim okresie czasu opisywano udział TNF- $\alpha$  w procesie resorpcji tkanki kostnej [7, 11, 35, 43, 67, 78].

W przeprowadzonych badaniach u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z KR wykazano istotną statystycznie różnicę wzrostu poziomu mRNA dla genu TNF- $\alpha$  (x157,14) w porównaniu do grupy kontrolnej. Wykonano test ELISA, w którym określono stężenie TNF- $\alpha$ , które w grupie badanej było znacznie wyższe (x17,6) niż w materiale biologicznym pobranym ze zwłok, co potwierdza ważną rolę tej cytokiny w patogenezie rozwoju przewlekłego zapalenia ucha środkowego z KR.

Sprawdzono stopień zależności poziomu mRNA dla TNF- $\alpha$  od ilości białka, zarówno w całej analizowanej populacji jak i w poszczególnych grupach. Analiza statystyczna wyników wykazała, że istnieje znamienne statystycznie związku (R=0,78) między poziomem mRNA danego genu a jego produktem białkowym w całej badanej populacji.

Dokonano ponadto porównania między poziomem mRNA dla TNF- $\alpha$  a poziomem jego białka w grupie badanej i kontrolnej. W przypadku ekspresji genów TNF- $\alpha$  stopień korelacji znacznie różnił się w obu grupach.

W przypadku ekspresji genu *TNF- $\alpha$*  zaobserwowano słabą korelację w grupie badanej (R= 0,49) i grupie kontrolnej (R=-0,14). Ciekawym spostrzeżeniem jest to, że w grupie badanej ten związek jest dodatni, a w grupie kontrolnej – ujemny. Zaobserwowane różnice w ekspresji genu *TNF- $\alpha$*  między grupą badaną a kontrolną mogą wynikać ze skrócenia czasu półtrwania ( $t_{1/2}$ ) tej cytokiny w niektórych stanach patologicznych oraz właściwością tej cytokiny autokrynnego pobudzenia jej produkcji [39, 44].

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej w poszukiwaniu korelacji między poziomem ekspresji genu *TNF- $\alpha$*  a danymi demograficznymi i cechami klinicznymi. W wyniku analizy statystycznej wykazano dodatnią prawie pełną korelację (R=0,91) poziomu mRNA TNF- $\alpha$  w stosunku do transkryptu białka referencyjnego ACTB a stopniem zaawansowania KR (n=35). Uzyskane wyniki wykazują związek poziomu ekspresji *TNF- $\alpha$*  z obecnością perforacji błony bębenkowej, ziarniny oraz wyciekami z ucha. Pacjenci z wyciekami oraz perforacją błony bębenkowej mieli wyższy poziom ekspresji *TNF- $\alpha$* , niż pacjenci bez tych objawów. Najniższy poziom

ekspresji genu *TNF- $\alpha$*  stwierdzono w II<sup>o</sup> zaawansowania KR, który stopniowo powiększał się wraz z pogłębieniem rozwoju kieszonki.

W wyniku analizy uzyskanych danych dotyczących stężenia *TNF- $\alpha$*  zaobserwowano podobną sytuację, czyli podwyższenie stężenia danego białka w bardziej zaawansowanych stopniach rozwoju KR w stosunku do wczesnego okresu ich rozwoju, co jest kolejnym potwierdzeniem, że jest to aktywny proces patologiczny.

Nie wykazano istotnej korelacji między poziomem ekspresji *TNF- $\alpha$*  a pozostałymi badanymi cechami.

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono prac określających poziom ekspresji genu *TNF- $\alpha$*  metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym oraz stężenie *TNF- $\alpha$*  za pomocą testów ELISA w materiale biologicznym z kieszonki retrakcyjnej u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego.

MMP-9 jest to zależny od cynku enzym proteolityczny, należący do endopeptydaz, których podstawową funkcją jest udział w fizjologicznych i patologicznych procesach przebudowy składników macierzy zewnątrzkomórkowej i ich degradowanie [6, 50, 57, 60, 82, 98, 115]. W warunkach fizjologicznych uczestniczą one w procesach takich jak embriogeneza, angiogeneza, gojenie ran oraz biorą udział w agregacji płytek, regulują metabolizm jonów. Zmiany aktywności metaloproteinaz zaobserwowano w wielu stanach patologicznych takich jak procesy zapalne, choroby degeneracyjne oraz w nowotworach [50, 60, 82, 98, 113, 150]. MMP-9 powoduje degradację kolagenu typu IV i V oraz innych białek macierzy zewnątrzkomórkowej, odgrywa rolę w procesie migracji granulocytów przez błonę podstawną. Uczestniczy w procesie gojenia nabłonka dróg oddechowych. W powiązaniu z TGF- $\beta$ 1 pobudza skurcz włókien kolagenowych, wspomagając zamknięcie rany [112, 115].

W grupie badanej średnia wartość poziomu ekspresji genu *MMP-9* była wyższa (x2,41) niż w materiale biologicznym pobranym ze zwłok.

Za pomocą testu ELISA określono stężenie MMP-9, które było znacznie wyższe (x40,23) niż w materiale biologicznym z grupy kontrolnej, co świadczy o aktywnej roli tej cytokiny w patogenezie powstania i rozwoju KR.

Sprawdzono stopień zależności poziomu mRNA dla MMP-9 od ilości białka, zarówno w całej analizowanej populacji jak i w poszczególnych jej grupach (badana, kontrolna). Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała, że istnieje znamienne statystycznie związek ( $R=0,81$ ) między poziomem mRNA danego genu a jego produktem białkowym w całej badanej populacji ( $n=60$ ). Dokonano ponadto porównania między poziomami mRNA dla MMP-9 z poziomem jego białka w poszczególnych grupach: badanej i kontrolnej. W przypadku ekspresji genów *MMP-9* stopień korelacji znacznie różnił się w obu grupach.

W przypadku ekspresji genu *MMP-9* zaobserwowano istotną statystycznie korelację w grupie badanej ( $R=0,91$ ) i grupie kontrolnej ( $R=0,21$ ). Duża różnica w poziomie ekspresji genu *MMP-9* między grupą badaną a grupą kontrolną świadczy o wzmożeniu aktywności cytokiny MMP-9 w procesie powstania i zaawansowania KR w porównaniu z grupą kontrolną.

W wyniku analizy statystycznej wykazano wysoką dodatnią korelację między poziomem mRNA *MMP-9* w stosunku do transkryptu białka referencyjnego TBP ( $R=0,58$ ) i stężeniem MMP-9 ( $R=0,51$ ) a stopniem zaawansowania KR u wszystkich

chorych (n=35). Nie wykazano związku między poziomem ekspresji genu *MMP-9* i stężeniem MMP-9 z danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi z KR.

U wszystkich pacjentów z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z KR zaobserwowano wzrost poziomu mRNA *MMP-9* w stosunku do zaawansowania rozwoju kieszonki. Najniższy poziom ekspresji genu *MMP-9* stwierdzono w II° zaawansowania KR, który stopniowo powiększał się z pogłębieniem procesu rozwoju kieszonki. W wyniku analizy danych dotyczących stężenia MMP-9 zaobserwowano podobną sytuację czyli podwyższenie stężenia danego białka w bardziej zaawansowanych stadiach rozwoju KR w stosunku do wczesnego stopnia jej rozwoju, co potwierdza rolę MMP-9 w patogenezie rozwoju kieszonki retrakcyjnej oraz pokazuje, że jest ona stanem aktywnym, dynamicznie rozwijającym się.

Nie wykazano związku między poziomem ekspresji genu *MMP-9* i stężeniem MMP-9 a danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi u chorych z KR.

RANKL jest białkiem uczestniczącym w metabolizmie kości (aktywacja osteoklastów), należące do rodziny czynników martwicy nowotworów. U ludzi kodowane jest przez gen *TNFSF11*. Jest czynnikiem aktywującym proces tworzenia dojrzałych osteoklastów: różnicowanie ich, fuzję, funkcjonowanie oraz ich przeżywanie. Poziom ekspresji RANKL nie ma liniowej korelacji z efektem tego ligandu. Wysokie stężenie białka RANKL wykrywane jest zwykle w płucach, grasicy i węzłach chłonnych, a niskie stężenie występuje w szpiku kostnym, żołądku, krwi obwodowej, grasicy, łożysku, leukocytach, sercu, tarczycy i mięśniach szkieletowych [114, 141, 154].

W wykonanych badaniach wykazano statystycznie istotną różnicę poziomu ekspresji genu *TNFSF11* u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną (x2714) w porównaniu do grupy kontrolnej.

Wykonano test ELISA, w którym określono stężenie RANKL. W grupie badanej stężenie RANKL było znacznie wyższe (x10) niż w materiale biologicznym pobranym ze zwłok. Dane te potwierdzają rolę TNF- $\alpha$  w patogenezie przewlekłego zapalenia ucha środkowego z KR.

Sprawdzono stopień zależności poziomu mRNA danego transkryptu od ilości białka zarówno w całej analizowanej populacji jak i w poszczególnych jej grupach (badana, kontrolna). Analiza statystyczna wyników wykonana przy użyciu współczynnika korelacji rang Spearmana wykazała, że istnieje znamienne statystycznie związku między poziomem mRNA danego genu a jego produktem białkowym w całej populacji (R=0,84), tj. grupie kontrolnej i badanej.

Podobny stopień korelacji zaobserwowano w poszczególnych grupach: badanej (R=0,53) i kontrolnej (R=0,44). Uzyskane dane dowodzą, że wzrost lub spadek poziomu mRNA dla *TNFSF11* skutkuje wzrostem lub spadkiem poziomu białka RANKL. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej i poszukiwano korelacji między poziomem ekspresji genu *TNFSF11* a danymi demograficznymi i cechami klinicznymi.

W wyniku analizy statystycznej wykazano dodatnią, prawie pełną korelację poziomu mRNA *TNFSF11* w stosunku do transkryptu białka referencyjnego TBP a stopniem zaawansowania KR (n=35).

Uzyskane wyniki wykazują związek między poziomem ekspresji genu *TNFSF11* a obecnością perforacji błony bębenkowej, ziarniną w uchu środkowym i zewnętrznym oraz wyciekami z ucha.

Nie wykazano korelacji między poziomem ekspresji genu *TNFSF11* a pozostałymi danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi.

W wyniku analizy statystycznej wykazano korelację między stężeniem RANKL a typem KR i stopniem jej zaawansowania, obecnością ziarniny w uchu środkowym i zewnętrznym oraz perforacją BB.

Wyższe stężenie RANKL zaobserwowano u pacjentów z KR części napiętej błony bębenkowej (n=25) w porównaniu z grupą pacjentów z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną części wiotkiej błony bębenkowej (n=10). Nie wykazano korelacji między stężeniem RANKL a pozostałymi danymi demograficznymi oraz cechami klinicznymi.

W grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z KR (n=35) zaobserwowano wzrost poziomu mRNA *TNFSF11* w zaawansowanych stadiach rozwoju KR. Najniższy poziom ekspresji genu *TNFSF11* stwierdzono w II stopniu zaawansowania KR, który stopniowo powiększał się wraz z pogłębieniem procesu rozwoju KR. W przypadku analizy danych dotyczących stężenia RANKL zaobserwowano inną sytuację. Zachowana jest tendencja do wzrostu stężenia RANKL w bardziej zaawansowanych stopniach rozwoju KR w stosunku do wczesnego stopnia rozwoju kieszonki, ale stężenie w III° zaawansowania jest nieco niższe w porównaniu z II° zaawansowania KR.

Przedstawione dane pokazują, że poziom ekspresji badanych cytokin może odzwierciedlać aktywność procesów zapalnych w przewlekłym zapaleniu ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną błony bębenkowej.

Wobec niekompletnych, niejednoznacznych, a często nawet kontrowersyjnych danych piśmienniczych, podjęto badania KR na poziomie ultrastruktury. Założyliśmy, iż wyniki naszych obserwacji pozwolą na lepsze poznanie etiopatogenezy rozwoju kieszonki retrakcyjnej i w konsekwencji przyczynią się do udoskonalenia działań prewencyjnych i terapeutycznych.

Analiza ultrastrukturalna materiału pobranego z błony bębenkowej z wykształconą kieszonką retrakcyjną wykazała zmiany morfologiczne, które w szczególności dotyczą:

- zaburzeń w budowie nabłonka zewnętrznego,
- formowania wpukleń nabłonka,
- zaniku błony podstawnej,
- braku wyodrębnionych warstw okrężnej i podłużnej włókien kolagenowych.

Analiza ultrastrukturalna wskazuje także na nasilenie procesów:

- zapalnych,
- migracji nabłonka,
- destrukcji włókien kolagenowych,
- autofagii.

Nasze obserwacje wykazały, że tworzeniu worka przepuklinowego KR towarzyszy deformacja błony bębenkowej. Jakkolwiek trzy podstawowe warstwy budujące błonę bębenkową: warstwa skórna, włóknista i warstwa śluzowa znajdują się w kieszonce retrakcyjnej to zaobserwowano jednak istotne zmiany zarówno w ich budowie histologicznej jak i na poziomie subkomórkowym. Zmiany te dotyczą głównie nabłonka zewnętrznego (warstwa naskórkowa) oraz blaszki właściwej.

Warstwa naskórkowa, która stanowi wyściółkę kieszonki retrakcyjnej zatracą charakterystyczną warstwowość a budujące ją komórki mają zmienione cechy morfologiczne. Dlatego też warstwa podstawna, warstwa kolczysta, warstwa ziarnista nabłonka są praktycznie nieodróżnialne.

W ocenianym materiale keratynocyty nabłonka najczęściej miały kształt wydłużony niezależnie od położenia. Ich układ często jest chaotyczny, a ilość charakterystycznych połączeń między desmosomami jest zredukowana. Stosunkowo niewiele filamentów pośrednich (tonofilamentów) występuje też w cytoplazmie. W obrazach w mikroskopie elektronowym obserwowano przerwanie ciągłości błony podstawnej komórek nabłonka, jej zanik lub zaburzoną budowę, zmniejszenie liczby hemidesmosomów a także liczne pseudopodia umożliwiające ruch komórki w różnych kierunkach. Pozwala to na stwierdzenie, iż keratynocyty nabłonka kieszonki retrakcyjnej mają zaburzony proces różnicowania i nie wykształcają w pełni cech charakterystycznych dla danej warstwy. Brak zróżnicowania komórek oraz zorientowanie równoległe w stosunku do błony podstawnej prawdopodobnie ma związek z ich wzmożoną migracją. Chociaż migracja komórek nabłonka pokrywającego błonę bębenkową od strony przewodu słuchowego jest zjawiskiem naturalnym [2, 12, 15], to w przypadku kieszonki retrakcyjnej możemy mówić o intensyfikacji procesu migracji. Inną ważną i interesującą cechą, którą zaobserwowano w badanym materiale była wyraźna tendencja do tworzenia wpukleń nabłonka w kierunku przylegającej błony śluzowej. Boedts i wsp., Boxall i wsp., Kakoi i wsp. oraz Tang i wsp. podkreślają istotną rolę wspomnianych struktur w patogenezie tworzenia kieszonki retrakcyjnej a w dalszej kolejności powstawania perlaka [143-146]. W ocenianym materiale zaobserwowano intensywny proces keratynizacji.

W tkance łącznej pod naskórkiem można było zaobserwować wiele zmian morfologicznych świadczących o trwających procesach degeneracyjnych. W cytoplazmie fibroblastów występowały znamiona nasilonego procesu autofagii. Obserwowano liczne postaci autofagosomów i autofagolizosomów a także nadmierną wakuolizację i utratę organelli komórkowych.

W tkance kieszonki retrakcyjnej występowały ogniskowo cechy toczącego się procesu zapalnego o czym świadczą miejscowe nacieki komórek układu odpornościowego. W mikroskopii elektronowej widoczne były obszary, w których komórki śródbłonka naczyniowego zostały uszkodzone, co powodowało nie tylko wysięk lecz także wynaczynienie elementów upostaciowanych.

Za bezpośrednią przyczyną tworzenia kieszonki retrakcyjnej uważane jest osłabienie włókien kolagenowych blaszki właściwej.

Faktycznie, obrazy z transmisyjnego mikroskopu elektronowego dokumentują wyraźnie zaburzony przebieg włókien kolagenowych. Ponadto obserwowano degenerację włókien kolagenowych o różnym stopniu nasilenia, powodowaną ich litycznym rozkładem. W niektórych zaś miejscach obecne były charakterystyczne skupiska mikrofibrili kolagenowych sugerujące toczący się proces naprawczy.

Jak do tej pory nie opracowano wszystkich kryteriów diagnostycznych obiektywnej oceny stanu ucha środkowego. Kontrowersyjne pozostają przyczyny powstania kieszonki retrakcyjnej oraz mechanizm procesu niszczenia kości. Mnogość hipotez na ten temat nie przyczynia się do wyboru najlepszej metody leczenia chirurgicznego przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną. Powstanie i rozwój kieszonki stanowi ważny problem dla otolaryngologów, gdyż może ona stanowić pole dla rozwoju perlaka.

Znajomość podstaw molekularnych procesu zapalnego w przewlekłym zapaleniu ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną mogłaby przyczynić się do rozwoju nowych metod diagnostycznych, kryterium oceny stanu zaawansowania KR błony bębenkowej oraz nowych metod profilaktyki powstania oraz leczenia farmakologicznego KR w późnych stadiach zaawansowania. W wielu jednostkach chorobowych prowadzone są obecnie badania IV fazy, ukierunkowane na konkretne cytokiny.

Autor wyraża przekonanie, że uzyskane wyniki w realizowanej pracy przyczynią się do lepszego poznania patogenezы przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną błony bębenkowej. Mogą także przyczynić się do rozwoju metody obiektywnej oceny stanu ucha środkowego oraz metod zapobiegania i leczenia zachowawczego przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną.



## 6. WNIOSKI

1. Poziom ekspresji genów *IL-1 $\alpha$* , *IL-6*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$* , *MMP-9* i *TNFSF11* w materiale biologicznym z KR błony bębenkowej jest istotnie wyższy niż w uchu zdrowym, co jest dowodem roli tych cytokin w etiopatogenezie kieszonki retrakcyjnej.
2. Istnieje znamiennej statystycznie związek między poziomem mRNA *IL-1 $\alpha$* , *IL-6*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$* , *MMP-9* i *TNFSF11* a ich produktem białkowym tak w populacji ogólnej, jak i w grupach badanej i kontrolnej, co może sugerować dużą wartość testu ELISA w ocenie ekspresji tych genów na poziomie białka.
3. Wykazano związek między poziomem ekspresji genu *IL-1 $\alpha$* , *IL-6*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$* , *MMP-9* i *TNFSF11* na poziomie mRNA oraz ich produktu białkowego a stopniem zaawansowania KR, obecnością perforacji błony bębenkowej, ziarniny w obrębie przewodu słuchowego i jamy bębenkowej oraz wycieku z ucha, co może być przydatne w obiektywnej ocenie stanu zaawansowania choroby.
4. Związek między poziomem ekspresji genu *IL-1 $\alpha$* , *IL-6*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$* , *MMP-9* oraz *RANKL* może być wykorzystany w opracowaniu metod monitorowania i zachowawczego leczenia przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną.
5. Wykazano związek między typem niedosłuchu a wiekiem pacjenta, poziomem niedosłuchu, obecnością szumów usznych oraz występowaniem zawrotów głowy. Wysoki odsetek szumów usznych oraz komponent odbiorczy niedosłuchu w późnych stadiach zaawansowania KR przemawia za toksycznym działaniem czynników zapalnych na komórki ucha wewnętrznego.
6. Zmiany strukturalne błony bębenkowej w KR dotyczą w szczególności nabłonka zewnętrznego, formowania wpukleń nabłonka, zaniku błony podstawnej błony bębenkowej oraz braku wyodrębnionych warstw okrężnej i podłużnej włókien kolagenowych.
7. Zmiany ultrastrukturalne błony bębenkowej sugerują nasilenie procesów: zapalnych, migracji nabłonka, destrukcji włókien kolagenowych oraz autofagii, co świadczy o aktywności procesu rozwoju KR oraz neguje kieszonkę jako pozostałość przebytego stanu chorobowego.
8. U podstaw rozwoju kieszonki retrakcyjnej leży proces zapalny, który jest czynnikiem aktywującym mechanizmy zewnątrz- i wewnątrzbębenkowe rozwoju kieszonki retrakcyjnej. Proces degradacji włókien kolagenowych i ich dezorganizacji, powstanie ognisk martwicy w warstwach błony bębenkowej powoduje osłabienie jej rusztowania i predysponuje do inwaginacji (wgłobienia) błony bębenkowej w stronę jamy bębenkowej w wyniku zaburzenia wentylacji jamy bębenkowej.

## 7. PIŚMIENNICTWO

1. Akyildiz N., Akbay C., Ozgürçin O.N., Bayramoglu I., Sayin N. The role of retraction pockets in cholesteatoma development: an ultrastructural study. *Ear Nose Throat J* 1993; 72: 210-212.
2. Ala Eddine C., Williams M., Ayache D. [Useful imaging of the ear]. *J Radiol* 2006; 87: 1728-1742
3. Alberti P. Epithelial migration on the tympanic membrane. *J Laryngol Otol* 1964; 78: 808-830.
4. Aleksandrowicz R., Ciszek B. *Anatomia kliniczna głowy i szyi*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2007, s. 506-507.
5. Alzahrani M., Saliba I. Tympanic membrane retraction pocket staging: is it worthwhile? *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2014; 271: 1361-1368.
6. Araújo A.A., Souza T., Moura L., Brito G., Aragão K., Araújo L., Medeiros C.A., Alves M.S., Araújo R.F. Jr. Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF- $\alpha$ , down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. *J Clin Periodontol* 2013; 40: 1104-1111.
7. Araújo A., Varela H., Brito G., Medeiros C., Araújo L. de S., do Nascimento J.H., de Araújo Júnior R.F. Azilsartan increases levels of IL-10, down-regulates MMP-2, MMP-9, RANKL/RANK, Cathepsin K and up-regulates OPG in an experimental periodontitis model. *PLoS One* 2014;9: e96750.
8. Ars B. Tympanic membrane. Retraction pocket. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1995; 49: 163-171.
9. Austin D. The retraction pocket in the treatment of cholesteatoma. *Arch Otolaryngol* 1976; 102: 741-743.
10. Proctor B. *Surgical anatomy of the ear and the temporal bone*. New York: Thieme Medical Publishers Inc.; 1989, s. 13-53.
11. Balga R., Wetterwald A., Portenier J., Dolder S., Mueller C., Hofstetter W. Tumor necrosis factor-alpha: alternative role as an inhibitor of osteoclast formation in vitro. *Bone* 2006; 39: 325-335.
12. Barbara M. Lateral attic reconstruction technique: preventive surgery for epitympanic retraction pockets. *Otol Neurotol* 2008; 29: 522-525.
13. Bastard J., Jardel C., Delattre J., Hainque B., Bruckert E., Oberlin F. Evidence for a link between adipose tissue interleukin-6 content and serum C-reactive protein concentrations in obese subjects. *Circulation* 1999;99: 2221-2222.
14. Bennett R. The significance and management of the drumhead retraction pocket. *J Laryngol Otol* 1970; 84: 167-189.
15. Bhide A. Etiology of the retraction pocket in the posterosuperior quadrant of the eardrum. *Arch Otolaryngol* 1977; 103: 707-711.16. Blair J., Zheng Y., Dunstan C. RANK ligand. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 1077-1081.
17. Bochenek A. *Anatomia człowieka*. Reicher M (red.):Warszawa: PZWL; 1989, s. 400-407.

18. Boedts D., Kuijpers W. Epithelial migration on the tympanic membrane. An experimental study. *Acta Otolaryngol* 1978; 85: 248-252.
19. Borgstein J., Gerritsma T., Bruce I., Feenstra L. Atelectasis of the middle ear in pediatric patients: safety of surgical intervention. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009; 73: 257-261.
20. Borgstein J., Gerritsma T., Wieringa M., Bruce I. The Erasmus atelectasis classification: proposal of a new classification for atelectasis of the middle ear in children. *Laryngoscope* 2007; 117: 1255-1259.
21. Borgstein J., Stoop E., Halim A., Feenstra L. The extraordinary healing properties of the pediatric tympanic membrane: a study of atelectasis in the pediatric ear. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2008; 72: 1789-1793.
22. Bremond G., Magnan J., Chays A., Florence A., Gignac D., Lebreuil G. [Retraction pockets, pathological entity?]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 1990; 107: 386-392.
23. Bremond G., Magnan J., Pradoura J. [Pre-cholesteatomatous states and their treatment]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 1976; 93: 203-206.
24. Broekaert D. The tympanic membrane: a biochemical updating of structural components. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1995; 49: 127-137.
25. Canellada A., Custidiano A., Abraham F., Rey E., Gentile T. Immunoregulatory cytokines in mouse placental extracts inhibit in vitro osteoclast differentiation of murine macrophages. *Placenta* 2013; 34: 231-239.
26. Cassano M., Cassano P. Retraction pockets of pars tensa in pediatric patients: clinical evolution and treatment. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010; 74: 178-182.
27. Chabot S., Williams G., Hamilton M., Sutherland G., Yong V.W. Mechanisms of IL-10 production in human microglia-T cell interaction. *J Immunol* 1999; 162: 6819-6828.
28. Chabot S., Yong V.W. Interferon beta-1b increases interleukin-10 in a model of T cell-microglia interaction: relevance to MS. *Neurology* 2000; 55: 1497-1505.
29. Chalat N. The structure of the tympanic membrane: a new concept or some thoughts on the structure of the tympanic membrane and its presentation as a dynamic organ. *Am J Otol* 1980; 2: 112-117.
30. Chan Y., Campisi P., James A., Papsin B. Tympanic membrane changes following paediatric cochlear implantation. *Cochlear Implants Int* 2005; 6: 10-15.
31. Chao W.Y., Tseng H.Z., Chang S.J. Eustachian tube dysfunction in the pathogenesis of cholesteatoma: clinical considerations. *J Otolaryngol* 1996; 25: 334-338.
32. Charachon R. Classification of retraction pockets. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)*. 1988; 109: 205-207.
33. Charachon R., Barthez M., Lejeune J. Spontaneous retraction pockets in chronic otitis media medical and surgical therapy. *Ear Nose Throat J* 1992; 71: 578-583.

34. Chen C.H., Lin C.J., Hwang Y.H., Ku C.J. Epidemiology of otitis media in Chinese children. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2003; 28: 442-445.
35. Collin-Osdoby P., Nickols G., Osdoby P. Bone cell function, regulation, and communication: a role for nitric oxide. *J Cell Biochem* 1995; 57: 399-408.
36. Constantin A., Loubet-Lescoulié P., Lambert N., Yassine-Diab B., Abbal M., Mazières B., de Préval C., Cantagrel A. Antiinflammatory and immunoregulatory action of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence of increased interleukin-4 and interleukin-10 gene expression demonstrated in vitro by competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 48-57.
37. Couloigner V., Molony N., Viala P., Contencin P., Narcy P., Van Den Abbeele T. Cartilage tympanoplasty for posterosuperior retraction pockets of the pars tensa in children. *Otol Neurotol* 2003; 24: 264-269.
38. D' Eredità R., Marsh R.R. Tympanic membrane healing process and biocompatibility of an innovative absorbable ventilation tube. *Otol Neurotol* 2006; 27: 65-70.
39. D'Souza N., Nelson S., Summer W., Deaciuc I. Expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 cell-surface receptors of the alveolar macrophage in alcohol-treated rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1994;18:1430-1435.
40. Danner C. Middle ear atelectasis: what causes it and how is it corrected? *Otolaryngol Clin North Am* 2006; 39: 1211-1219.
41. de Brito L., Teles F., Teles R., Totola A., Vieira L., Sobrinho A.P. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *J Endod* 2012; 38: 481-485.
42. de Moraes M., de Lucena H., de Azevedo P., Queiroz L., Costa Ade L. Comparati veimmunohisto chemical expressionof RANK, RANKL and OPG in radicular and dentigerous cysts. *Arch Oral Biol* 2011; 56:1256-1263.
43. de Moraes M., de Matos F., de Souza L., de Almeida Freitas R., de Lisboa Lopes Costa A. Immunoexpression of RANK, RANKL, OPG, VEGF, and vWF in radicular and dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med* 2013; 42: 468-473.
44. Deaciuc I., Alappat J., McDonough K., D'Souza N. Interleukin-6 tumor necrosis factor-alpha clearance and metabolism in vivo and by the isolated, perfused liver in the rat: effect of acute alcohol administration. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 293-301.
45. Deguine C. Secondary retraction pockets. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)*. 1988; 109: 231-234.
46. Deguine C. [Pathogenesis of cholesteatoma: contribution of otoscopic photography]. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 1995; 116: 61-63.
47. Eden A., Gannon P. Neural control of middle ear aeration. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1987; 113: 133-137.
48. Ertault-Daneshpouy M., Leboeuf C., Lemann M., Bouhidel F., Ades L., Gluckman E., Socié G., Janin A. Pericapillary hemorrhage as criterion of

- severe human digestive graft-versus-host disease. *Blood* 2004; 103: 4681-4684.
49. Evans K., Fox S. Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. *BMC Cell Biol* 2007; 8: 4.
  50. Feng M., Wang H., Wang Q., Guan W. Matrix metalloprotease 9 promotes liver recovery from ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 2013; 180: 156-161.
  51. Ferlito A. A review of the definition, terminology and pathology of aural cholesteatoma. *J Laryngol Otol* 1993; 107: 483-488.
  52. Forséni M., Bagger-Sjöbäck D., Hultcrantz M. A study of inflammatory mediators in the human tympanosclerotic middle ear. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127: 559-564.
  53. Fujita A., Takahashi H., Honjo I. Etiological role of adenoids upon otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol Suppl* 1988; 454: 210-213.
  54. Janczewski G. *Otolaryngologia praktyczna*. Wyd. I ed. T. 1. Gdansk: Via Medica.; 2007, s. 2-47.
  55. Gantz B. Epidermal Langerhans cells in cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1984; 93: 150-156.
  56. Gonzalez C., Bluestone C. Visualization of a retraction pocket/cholesteatoma: indications for use of the middle ear telescope in children. *Laryngoscope* 1986; 96: 109-110.
  57. Grant M., Wilson J., Rock P., Chapple I. Induction of cytokines, MMP9, TIMPs, RANKL and OPG during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod* 2013; 35: 644-651.
  58. Gray H. *Anatomy of the Human Body*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1985; s. 917-918.
  59. Grewal D., Hathiram B., Moliorikar A., Santhosli D., Rajeevan T. Retraction pockets in chronic suppurative otitis media- our experience. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 55: 107-112.
  60. Guo W., Bai X., Han Y., Xu L., Liu W., Zhang G., Li J., Fan Z., Wang H. Expressions of TGF- $\beta$ 1 and MMP-9 in a guinea pig model of tympanosclerosis: possible role in the pathogenesis of this disorder. *Laryngoscope* 2012; 122: 2037-2042.
  61. Hashizume M., Ohsugi Y. IL-6 as a target in inflammation. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2015; 15(3):206-211.
  62. Hill P. Bone remodelling. *Br J Orthod* 1998; 25: 101-107.
  63. Holgersen K., Kutlu B., Fox B., Serikawa K., Lord J., Hansen A., Holm T.L. High-resolution gene expression profiling using RNA sequencing in patients with inflammatory bowel disease and in mouse models of colitis. *J Crohns Colitis* 2015; 9(6):492-506.
  64. Ichimiya I., Kurono Y., Mogi G. Immunology of the tympanic membrane. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1995; 49: 121-125.
  65. Isobe A., Sawada K., Kinose Y., Ohyagi-Hara C., Nakatsuka E., Makino H., Ogura T., Mizuno T., Suzuki N., Morii E., Nakamura K., Sawada I., Toda

- A., Hashimoto K., Mabuchi S., Ohta T., Morishige K., Kurachi H., Kimura T. Interleukin 6 receptor is an independent prognostic factor and a potential therapeutic target of ovarian cancer. *PLoS One* 2015; 10: e0118080.
66. Jeong J., Park C., Tae K., Lee S., Shin D., Kim K., Park Y. Expression of RANKL and OPG in middle ear cholesteatoma tissue. *Laryngoscope* 2006; 116: 1180-1184.
67. Jules J., Shi Z., Liu J., Xu D., Wang S., Feng X. Receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) cytoplasmic IVVY535-538 motif plays an essential role in tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF)-mediated osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2010; 285: 37427-37435.
68. Kakoi H., Anniko M. Auditory epidermal cell migration. V. Transmission electron-microscopic study of tympanic membrane and external auditory canal in the mouse. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1996; 58: 280-287.
69. Niemczyk K., Skarżyński H. Kieszonki retrakcyjne patogeneza i klasyfikacje. Warszawa: Audiofonologia, 1996; VIII: s. 89-97.
70. Kennedy G., Varelias A., Vuckovic S., Laetitia Le T., Kate H., Ping Z., Gethin T., Anderson L., Boyle G., Cloonan N., Leach J., Sturgeon E., Avery J., D Olver S., Lor M., Misra K., Hutchins C., Morton J., Durrant T., Subramoniapillai E., Butler J., Curley C., Kelli P., MacDonald A., Siok-Keen T., Hill G. Addition of interleukin-6 inhibition with tocilizumab to standard graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic stem-cell transplantation: a phase 1/2 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15: 1451-1459.
71. Kitowska A., Pawełczyk T. N-myc downstream regulated 1 gene and its place in the cellular machinery. *Acta Biochim Pol* 2010; 57: 15-21.
72. Knutsson J., Bagger-Sjöbäck D., von Unge M. Structural tympanic membrane changes in secretory otitis media and cholesteatoma. *Otol Neurotol* 2011; 32: 596-601.
73. Kobayashi T., Toshima M., Yaginuma Y., Ishidoya M., Suetake M., Takasaka T. Pathogenesis of attic retraction pocket and cholesteatoma as studied by computed tomography. *Am J Otol* 1994; 15: 658-662.
74. Kokko E. Chronic secretory otitis media in children. A clinical study. *Acta Otolaryngol Suppl* 1974; 327: 1-44.
75. Kothari P., Pestana R., Mesraoua R., Elchaki R., Khan K., Dannenberg A., Falcone D. IL-6-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 is modulated by JAK-dependent IL-10 expression in macrophages. *J Immunol* 2014; 192: 349-357.
76. Kristiansen O., Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes* 2005; 54 Suppl 2: S114-124.
77. 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.
78. Kuczkowski J., Sakowicz-Burkiewicz M., Iżycka-Świeszewska E., Ikażewski B., Pawełczyk T. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\alpha$ ,

- interleukin-6 and interleukin-10 in chronic otitis media with bone osteolysis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2011; 73: 93-99.
79. Lulan N., St-Pierre Y. Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) and epidermal growth factor (EGF) inhibit metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in cancer cells. *Oncoscience* 2015; 2: 309-316.
80. Lee S., Park S., Cho Y., Park K., Kim E., Jung K., Kim S., Kim W., Moon S. Activation of matrix metalloproteinase-9 by TNF-alpha in human urinary bladder cancer HT1376 cells: the role of MAP kinase signaling pathways. *Oncol Rep* 2008; 19: 1007-1013.
81. Lee S., Gardner A., Kalinowski J., Jastrzebski S., Lorenzo J. RANKL-stimulated osteoclast-like cell formation in vitro is partially dependent on endogenous interleukin-1 production. *Bone* 2006; 38: 678-685.
82. Lehman D., Wilmoth J., Prevatt A., et al. Inhibition of matrix metalloproteinases in gerbil cholesteatoma: preliminary findings. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 126: 404-408.
83. Leibbrandt A., Penninger J. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143: 123-150.
84. Lim D. Tympanic membrane. Electron microscopic observation. I: pars tensa. *Acta Otolaryngol* 1968; 66: 181-198.
85. Lim D. Tympanic membrane. II. Pars flaccida. *Acta Otolaryngol* 1968; 66: 515-532.
86. Lim D. Human tympanic membrane. An ultrastructural observation. *Acta Otolaryngol* 1970; 70: 176-186.
87. Lim D. Structure and function of the tympanic membrane: a review. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1995; 49: 101-115.
88. Litton W. Epithelial migration over tympanic membrane and external canal. *Arch Otolaryngol* 1963; 77: 254-257.
89. Liu W., Liu Y., Jiang H., Ding X., Zhu R., Li B., Zhao Y. Plasma levels of interleukin 18, interleukin 10, and matrix metalloproteinase-9 and -137G/C polymorphism of interleukin 18 are associated with incidence of in-stent restenosis after percutaneous coronary intervention. *Inflammation* 2013; 36: 1129-1135.
90. Liu Z., Xu J., Li H., Zheng Y., He J., Liu H., Zhong Y., Lu Y., Hong B., Zhang M., Lin P., Du J., Hou J., Qian J., Kwak L., Yi Q., Yang J. Bone marrow stromal cells derived MCP-1 reverses the inhibitory effects of multiple myeloma cells on osteoclastogenesis by upregulating the RANK expression. *PLoS One* 2013; 8: e82453.
91. Lobo G., Monasterios M., Rodrigues J., Gamboa N., Capparelli M., Martínez-Cuevas J., Lein M., Jung K., Abramjuk C., Charris J. Synthesis, crystal structure and effect of indeno[1,2-b]indole derivatives on prostate cancer in vitro. Potential effect against MMP-9. *Eur J Med Chem* 2015; 96: 281-295.
92. Lyubimova N., Kozharskaya G., Portnoi S., Kushlinskii N. Biochemical markers of bone metabolism in breast cancer. *Bull Exp Biol Med* 2014; 157: 769-772.

93. Macedo R., Lacerda S., Thomazini J., Brentegani L. Bone integration behavior of hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate graft Implanted in dental alveoli: a histomorphometric and scanning electron microscopy study. *Implant Dent* 2014; 710-715.
94. Maciel K., Neves de Brito L., Tavares W., Moreira G., Nicoli J., Vieira L., Ribeiro Sobrinho A. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *Int Endod J* 2012; 45: 354-362.
95. Mansouri B., Richards L., Menter A. Treatment of two patients with generalized pustular psoriasis with the interleukin-1 $\beta$  inhibitor gevokizumab. *Br J Dermatol* 2014;
96. Maw A., Bawden R. Tympanic membrane atrophy, scarring, atelectasis and attic retraction in persistent, untreated otitis media with effusion and following ventilation tube insertion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1994; 30: 189-204.
97. Mazziotti S., Arceri F., Vinci S., Salamone I., Racchiusa S., Pandolfo I. Role of coronal oblique reconstruction as a complement to CT study of the temporal bone: normal anatomy. *Radiol Med* 2006; 111: 607-617.
98. McDonald M., Morse A., Mikulec K., Peacock L., Baldock P., Kostenuik P., Little D. Matrix metalloproteinase-driven endochondral fracture union proceeds independently of osteoclast activity. *J Bone Miner Res* 2013; 28: 1550-1560.
99. Meghji S. Bone remodelling. *Br Dent J* 1992; 172: 235-242.
100. Mewes T., Mann W. [Function of the eustachian tube in epitympanic retraction pockets]. *HNO* 1998; 46: 914-918.
101. Mionskowski T., Kuczkowski J., Sakowicz-Burkiewicz M. Określenie profilu ekspresji genu TNF $\alpha$  w wybranych strukturach ucha środkowego u chorych na tymanosklerozę. *Otolaryngol Pol* 2012; 66: 20-24.
102. Miyanaga S., Morimitsu T. Prussak's space: chronological development and routes of aeration. *Auris Nasus Larynx* 1997; 24: 255-264.
103. Miyasato M., Takeno S., Hirakawa K. Expression of RANKL and proliferation abilities of cultured human middle ear cholesteatoma epithelial cells. *Hiroshima J Med Sci* 2013; 62: 1-6.
104. Nason R., Jung J., Chole R. Lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis from mononuclear precursors: a mechanism for osteolysis in chronic otitis. *J Assoc Res Otolaryngol* 2009; 10: 151-160.
105. Ohnishi T., Shirahata Y., Fukami M., Hongo S. The atelectatic ear and its classification. *Auris Nasus Larynx* 1985; 12 Suppl 1: S211-213.
106. Ozkiriş M., Kapusuz Z., Saydam L. The prevalence of middle ear diseases among 7- to 13-year-old primary school students in Yozgat province. *Turk J Pediatr* 2012; 54: 493-496.
107. Palva T., Northrop C., Ramsay H. Aeration and drainage pathways of Prussak's space. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2001; 57: 55-65.
108. Paparella M., Jung T. Experience with tympanoplasty for atelectatic ears. *Laryngoscope* 1981; 91: 1472-1477.



109. Pawelczyk T., Sakowicz-Burkiewicz M., Wesserling M., Grden M., Kuczkowski J. Altered response of fibroblasts from human tympanosclerotic membrane to interacting mast cells: implication for tissue remodelling. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;
110. Pedersen B., Fischer C. Beneficial health effects of exercise - the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 152-156.
111. Pinlaor S., Prakobwong S., Boonmars T., Wongkham C., Pinlaor P., Hiraku Y. Effect of praziquantel treatment on the expression of matrix metalloproteinases in relation to tissue resorption during fibrosis in hamsters with acute and chronic *Opisthorchis viverrini* infection. *Acta Trop* 2009; 111: 181-191.
112. Poitevin S., Garnotel R., Antonicelli F., Gillery P., Nguyen P. Type I collagen induces tissue factor expression and matrix metalloproteinase 9 production in human primary monocytes through a redox-sensitive pathway. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1586-1594.
113. Porter K., Turner N., O'Regan D., Ball S. Tumor necrosis factor alpha induces human atrial myofibroblast proliferation, invasion and MMP-9 secretion: inhibition by simvastatin. *Cardiovasc Res* 2004; 64: 507-515.
114. Proctor B. Surgical anatomy and embryology of the middle ear. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1963, 67: 801-814.
115. Ribeiro A., Silva M., Araújo R., Ferrucci D., Mineo T., Thiesen R., Bandarra M., Laus J. Expression of matrix metalloproteinases, type IV collagen, and interleukin-10 in rabbits treated with morphine after lamellar keratectomy. *Vet Ophthalmol* 2012; 15: 153-163
116. Robinson E., Werth V. The role of cytokines in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Cytokine*. 2015, 73(2):326-334.
117. Rosean T., Tompkins V., Tricot G., Holman C., Olivier A., Zhan F., Janz S. Preclinical validation of interleukin 6 as a therapeutic target in multiple myeloma. *Immunol Res* 2014; 59: 188-202.
118. Ruah C., Schachern P., Paparella M., Zelterman D. Mechanisms of retraction pocket formation in the pediatric tympanic membrane. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1992; 118: 1298-1305.
119. Sadeghi H., Lockmann A., Hund A., Samavedam U., Papi E., Vafia K., Hauenschild E., Kalies K., Pas H., Jonkman M., Iwata H., Recke A., Schön M., Zillikens D., Schmidt E., Ludwig R. Caspase-1-independent IL-1 release mediates blister formation in autoantibody-induced tissue injury through modulation of endothelial adhesion molecules. *J Immunol*. 2015, 194: 3656-3663.
120. Sade J. Retraction pockets and attic cholesteatomas. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1980; 34: 62-84.
121. Sade J. Atelectatic tympanic membrane: histologic study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993; 102: 712-716.
122. Sade J. Treatment of cholesteatoma and retraction pockets. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1993; 250: 193-199.

123. Sade J., Avraham S., Brown M. Atelectasis, retraction pockets and cholesteatoma. *Acta Otolaryngol* 1981; 92: 501-512.
124. Sade J., Berco E. Atelectasis and secretory otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1976; 85: 66-72.
125. Sade J., Fuchs C., Luntz M. The pars flaccida middle ear pressure and mastoid pneumatization index. *Acta Otolaryngol* 1996; 116: 284-287.
126. Sharp J., Robinson J. Treatment of tympanic membrane retraction pockets by excision. A prospective study. *J Laryngol Otol* 1992; 106: 882-886.
127. Shunyu N., Gupta S., Thakar A., Sharma S. Histological and immunohistochemical study of pars tensa retraction pocket. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2011; 145: 628-631.
128. Shunyu N., Gupta S., Thakar A., Sharma S. Histological and immunohistochemical study of pars flaccida retraction pocket. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2011; 145: 631-634.
129. Singh A., Mehdi A., Srivastava R., Verma N. Immunoregulation of bone remodelling. *Int J Crit Illn Inj Sci* 2012; 2: 75-81.
130. Skotnicka B, Hassmann-Poznańska E. Myringoplastyka u dzieci – czynniki wpływające na wynik leczenia chirurgicznego. *Otolaryngol Pol* 2008; 62: 65-70.
131. Soysa N., Alles N., Aoki K., Ohya K. Osteoclast formation and differentiation: an overview. *J Med Dent Sci* 2012; 59: 65-74.
132. Srinivasan V., Banhegyi G., O'Sullivan G., Sherman I. Pars tensa retraction pockets in children: treatment by excision and ventilation tube insertion. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2000; 25: 253-256.
133. Stangerup S., Tos M., Arnesen R., Larsen P. A cohort study of point prevalence of eardrum pathology in children and teenagers from age 5 to age 16. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1994; 251: 399-403.
134. Sundaram K., Nishimura R., Senn J., Youssef R., London S., Reddy S. RANK ligand signaling modulates the matrix metalloproteinase-9 gene expression during osteoclast differentiation. *Exp Cell Res* 2007; 313: 168-178.
135. Syngle A., Verma I., Krishan P. Interleukin-6 blockade improves autonomic dysfunction in rheumatoid arthritis. *Acta Reumatol Port* 2015; 40: 85-88.
136. Takizawa Y., Mizuta K., Hamada N., Yamatodani T., Nakanishi H., Hosokawa K., Takahashi G., Sugiyama K., Mineta H. Relationship between tympanic membrane retraction and habitual sniffing in patients with cholesteatoma. *Acta Otolaryngol* 2013; 133: 1030-1034.
137. Tang I., Prepageran N., Raman R., Sharizhal T. Epithelial migration in the atelectatic tympanic membrane. *J Laryngol Otol* 2009; 123: 1321-1324.
138. Teitelbaum S. Osteoclasts; culprits in inflammatory osteolysis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: 201.
139. Tos M. Cartilage tympanoplasty methods: proposal of a classification. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 139: 747-758.
140. Tos M., Poulsen G. Attic retractions following secretory otitis. *Acta Otolaryngol* 1980; 89: 479-486.

141. Troen B. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Exp Gerontol* 2003; 38: 605-614.
142. Truy E., Disant F., Tiollier J., Froehlich P., Morgon A. A clinical study of human type IV collagen as tympanic membrane grafting material. Preliminary noncomparative study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 120: 1329-1332.
143. Tukaj C., Kuczkowski J., Sakowicz-Burkiewicz M., Gulida G., Tretiakow D., Mionskowski T., Pawełczyk T. Morphological alterations in the tympanic membrane affected by tympanosclerosis: ultrastructural study. *Ultrastruct Pathol* 2014; 38: 69-73.
144. Van der Jeught S., Dirckx J., Aerts J., Bradu A., Podoleanu A., Buytaert J. Full-field thickness distribution of human tympanic membrane obtained with optical coherence tomography. *J Assoc Res Otolaryngol* 2013; 14: 483-494.
145. Van der Poll T., Keogh C., Guirao X., Buurman W., Kopf M., Lowry S. Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 1997; 176: 439-444.
146. Vitale R., Ribeiro F. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. *Braz J Otorhinolaryngol* 2007; 73: 117-121.
147. Walker C., Ito Y., Dangaria S., Luan X., Diekwisch T. RANKL, osteopontin, and osteoclast homeostasis in a hyperocclusion mouse model. *Eur J Oral Sci* 2008; 116: 312-318.
148. Walker P., Mowry S., Hansen M., Gantz B. Long-term results of canal wall reconstruction tympanomastoidectomy. *Otol Neurotol* 2014; 35: 954-960.
149. Walsh R., Pracy J., Harding L., Bowdler D. Management of retraction pockets of the pars tensa in children by excision and ventilation tube insertion. *J Laryngol Otol* 1995; 109: 817-820.
150. Wang J., Yu L. [Expression of matrix metalloproteinase-2,9 in cholesteatoma from different positions]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2009; 44: 44-48.
151. Weiss T., Arnesen H., Seljeflot I. Components of the interleukin-6 transsignalling system are associated with the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and arterial stiffness. *Metabolism* 2013; 62: 1008-1013.
152. Wells M., Michaels L. Role of retraction pockets in cholesteatoma formation. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1983; 8: 39-45.
153. Wilmoth J., Schultz G., Antonelli P. Tympanic membrane metalloproteinase inflammatory response. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129: 647-654.
154. Wolfman D., Chole R. Experimental retraction pocket cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1986; 95: 639-644.
155. Yoon T., Schachern P., Paparella M., Aeppli D. Pathology and pathogenesis of tympanic membrane retraction. *Am J Otolaryngol*. 1990; 11: 10-17.
156. Zhang J, Zhu L, Peng B. Effect of bioaggregate on osteoclast differentiation and inflammatory bone resorption in vivo. *Int Endod J* 2014:

157. Zhang Q., Sun L., Qi J., Yang Z., Huang T. Influence of adipocytokines and periprostatic adiposity measurement parameters on prostate cancer aggressiveness. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 1879-1883.
158. Zhao Q., Shao J., Chen W., Li Y. Osteoclast differentiation and gene regulation. *Front Biosci* 2007; 12: 2519-2529.
159. Zheng Y., Ou Y., Yang H., Liu X., Chen S., Liu W. Clinical manifestation of attic retraction pocket. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 2005; 19: 737-739.

## 7. STRESZCZENIE

Przewlekłe zapalenie ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną (KR) jest jedną z form przewlekłego zapalenia ucha środkowego. Powstanie i rozwój KR stanowi ważny problem dla otolaryngologów, gdyż może ona stanowić stan przedperlakowy. Kontrowersyjne są przyczyny powstania kieszonki retrakcyjnej oraz mechanizm procesu niszczenia kości. Niejasność etiopatogenezy tej choroby często utrudnia prawidłowe jej leczenie.

Celem pracy było określenie poziomu ekspresji genów cytokin prozapalnych (IL-1 $\alpha$ , IL-6) i przeciwzapalnych (IL-10) oraz mediatorów RANKL, TNF- $\alpha$  i MMP-9 w materiale biologicznym pobranym od chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego z KR w porównaniu do grupy kontrolnej. Określono korelację między poziomem ekspresji genów badanych cytokin a stopniem zaawansowania KR, obrazem klinicznym oraz stopniem niedosłuchu. Oceniono korelację między obrazem w mikroskopie elektronowym a typem i stopniem zaawansowania KR, poziomem ekspresji genów badanych cytokin.

Badanie zostało wykonane u chorych operowanych z powodu niedosłuchu w przebiegu przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną. Grupę kontrolną stanowił materiał biologiczny pobierany ze zwłok ludzi, zmarłych śmiercią nagłą, bez chorób uszu, w czasie rutynowej sekcji w Zakładzie Medycyny Sądowej.

Oznaczono poziom ekspresji genów *IL-1 $\alpha$* , *IL-6*, *IL-10*, *TNFSF11*, *TNF- $\alpha$*  i *MMP-9* w badanym materiale. Poziom mRNA dla badanych genów oznaczono podczas reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym. Stężenie białka dla badanych cytokin w homogenacie tkankowym oznaczono metodą ELISA za pomocą komercyjnych zestawów. Badanie ultrastrukturalne, ocena materiału i dokumentacja fotograficzna była dokonywana w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej a poziom ekspresji genów badanych cytokin został skorelowany z danymi klinicznymi oraz demograficznymi.

Grupa badana składała się z 7 (20%) mężczyzn oraz 28 (80%) kobiet. Wiek pacjentów wahał od 18 do 45 lat. Mediana wieku w grupie badanej wyniosła 36,67 lat (mężczyźni – 39,71 lat; kobiety – 35,88 lat). Zmiany chorobowe dotyczyły tylko jednego ucha u wszystkich pacjentów.

Wśród objawów laryngologicznych przewlekłego zapalenia ucha środkowego odnotowano: szumy uszne u 6 (17,14%) pacjentów; wyciek z ucha u 11 (31,43%); okresowe zawroty głowy u 6 (17,14%).

W badaniu mikrootoskopowym wykazano lokalizację KR w części wiotkiej błony bębenkowej u 10 (28,57%) oraz w części napiętej u 25 (71,43%) pacjentów. Nie obserwowano pacjentów z kieszonką retrakcyjną w I stadium rozwoju, co może wynikać z braku dolegliwości u tych chorych.

Analizując wyniki badań audiometrycznych okazało się, że niedosłuch przewodzeniowy występował u 22 (62,8%), niedosłuch mieszany – u 13 (37,2%) pacjentów. Większość mężczyzn w grupie badanej miała niedosłuch niewielkiego (42,8%) i umiarkowanego stopnia (42,8%). Istotnie statystycznie więcej kobiet niż mężczyzn miało niedosłuch umiarkowany (64,2% kobiet).

W wyniku badań molekularnych wykazano, że poziom ekspresji genów *IL-1 $\alpha$* , *IL-6*, *IL-10*, *TNFSF11*, *TNF- $\alpha$*  i *MMP-9* w materiale biologicznym z kieszonki retrakcyjnej był istotnie wyższy niż w uchu zdrowym, co jest dowodem roli tych cytokin w etiopatogenezie rozwoju kieszonki retrakcyjnej. Wykazano znamiennej statystycznie związek między poziomem mRNA badanych genów a ich produktem białkowym jak w populacji ogólnej, tak i w grupie badanej i kontrolnej, co może sugerować o dużej wartości testu ELISA w ocenie ekspresji badanych genów na poziomie białka.

Poszukując związku między profilem ekspresji badanych genów a czynnikami demograficznymi oraz klinicznymi wykazano, że:

- istnieje związek między poziomem ekspresji genu *IL-1 $\alpha$* , *IL-6*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$*  i *TNFSF11* na poziomie mRNA oraz jego produktu białkowego a stopniem zaawansowania KR, perforacją błony bębenkowej, ziarniną w przewodzie słuchowym i jamie bębenkowej oraz wyciekami z ucha, co może być przydatne w ocenie obiektywnej stanu zaawansowania choroby,

- istnieje związek między poziomem ekspresji genu *MMP-9* na poziomie mRNA oraz jego produktu białkowego a stopniem zaawansowania KR,

- poziom ekspresji genu *IL-6*, *MMP-9* jest wyższy w bardziej zaawansowanych stadiach kieszonki retrakcyjnej, co może świadczyć o znacznej roli tych cytokin na późnym stadium zaawansowania choroby,

- uwzględniając działanie przeciwzapalne *IL-10* i obserwując podwyższony poziom ekspresji jej genu we wczesnych stadiach choroby można przypuszczać, że uczestniczy ona w patomechanizmie regresji zmian patologicznych, tocących się w tkankach kieszonki retrakcyjnej,

- poziom ekspresji genu *TNF- $\alpha$* , *TNFSF11* jest bardzo wysoki we wszystkich stadiach zaawansowania kieszonki, co jest dowodem aktywnego procesu zapalnego na wszystkich etapach rozwoju KR.

Wysoki odsetek występowania szumów usznych oraz komponenty odbiorczej niedosłuchu w późnych stadiach zaawansowania KR przemawia za toksycznym działaniem czynników zapalnych na komórki ucha wewnętrznego.

Przeprowadzając badanie ultrastrukturalne stwierdzono, że zmiany morfologiczne błony bębenkowej w szczególności dotyczą zaburzeń w budowie nabłonka zewnętrznego, formowania wpukleń nabłonka, zaniku błony podstawnej błony bębenkowej oraz braku wyodrębnionych warstw okrężnej i podłużnej włókien kolagenowych. Zmiany ultrastrukturalne w błonie bębenkowej sugerują nasilenie procesów: zapalnych, migracji nabłonka, destrukcji włókien kolagenowych oraz autofagii, co świadczy o aktywności procesu rozwoju KR oraz neguje kieszonkę jako pozostałość przebytego stanu patologicznego.

Uzyskane wyniki w realizowanej pracy przyczyniają się do lepszego poznania patogenezy przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną błony bębenkowej. Mogą także przyczynić się do rozwoju metody obiektywnej oceny stanu ucha środkowego oraz metod zapobiegania i leczenia zachowawczego przewlekłego zapalenia ucha środkowego z kieszonką retrakcyjną.

## 8. SUMMARY

Chronic otitis media with retraction pocket (RP) of tympanic membrane is a form of chronic inflammation of the middle ear. The emergence and development of the RP is an important issue for otorhinolaryngologists, because it predisposing to the formation of cholesteatoma. Controversial is etiology of the retraction pockets creation and the mechanism of osteolysis into RP. Lack of clarity of the etiopathogenesis of the disease is often makes difficult correct treatment.

The aim of the study was to determine the level of gene expression pro-inflammatory (IL-1 $\alpha$ , IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines, the mediators of RANKL, TNF- $\alpha$  and MMP-9 in biological materials collected from patients with chronic otitis media with RP compared to the control group. Determine the correlation between the level of gene expression of the examined cytokines and the RP severity, the clinical signs and the degree of hearing loss. Correlation between electron microscope image and the type and severity of RP, the level of gene expression of the examined cytokines.

The study was performed in patients operated on because of hearing loss due to chronic otitis media with retraction pocket. The control group was a biological material taken from the corpses of people who died sudden death, without any ear diseases during routine section of the Department of Forensic Medicine.

Determined the level of expression of IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, TNFSF11, TNF- $\alpha$  and MMP-9 from the samples. Level of mRNA for the tested genes were determined by RT-PCR in real time. The protein concentration for the tested cytokine in the tissue homogenates was determined by ELISA test using commercial kits. Ultrastructural study, evaluation of material and photographic documentation were made in a transmission electron microscope. The results were statistically analyzed and the level of gene expression of the examined cytokines was correlated with demographic and clinical data.

The study group consisted of 7 (20%) men and 28 (80%) of women. The age of patients according to the criteria exclusive, comprise from 18 to 45 years. The median age in the study group was 36.67 years (men - 39.71 years; women - 35.88 years). The lesions involved only one ear in all patients.

Among the symptoms of chronic otitis media reported: tinnitus in 6 (17.14%) patients; leaking from the ear in 11 (31.43%); periodic dizziness in 6 (17.14%).

The otoscopy was shown the location of the RP in the pars flaccid the tympanic membrane in 10 (28.57%) and a pars tense in 25 (71.43%) patients. There were no patients with retraction pocket in the 1-st development stage, which may result from the lack of complaints from the ear or the possibility of conservative treatment in a given stage of development.

Analyzing the results of audiometric tests found that the conductive hearing loss was 22 (62.8%), mixed hearing loss - 13 (37.2%) patients. Most of the men in the study group had a slight hearing loss (42.8%) and moderate degree (42.8%). Significantly more women than men had moderate hearing loss (64.2% women).

As a result of molecular studies it has demonstrated that the expression level of IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, TNFSF11, TNF- $\alpha$  and MMP-9 in the biological material of the retraction pocket is significantly higher than in the healthy ear, which is evidence of the role of these cytokines in the etiopathology of the retraction pocket. It has been shown statistically significant association between the mRNA levels of the studied genes and their protein product in the general population, and so the treated and control groups, suggesting a high value of the ELISA test for assessment of gene expression at the protein level.

Searching for the relationship between the profile of gene expression and clinical and demographic factors has been demonstrated that:

- there is a correlation between mRNA and protein expression levels for IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  and TNFSF11 genes and the stage of RP, tympanic membrane perforation, granulation tissue and the ear leaking, which may be useful in assessing the severity of an objective disease,
- there is a relationship between mRNA and protein expression levels for MMP-9 and its protein product and the stage of RP,
- the expression level for IL-6, MMP-9 genes is higher in the more advanced stages of retraction pocket, which may indicate a significant role of these cytokines at a late stage of the disease,
- having regard to anti-inflammatory IL-10 and observing the increased expression level for gene in the early stages of the disease can be assumed that it is involved in the pathogenesis of pathological changes regression in the tissue of the retraction pocket,
- the expression level for TNF- $\alpha$ , RANKL genes is very high in all stages of RP, which is evidence of active inflammation at its all stages.

The high prevalence of tinnitus and neuro-sensorial component of hearing loss in the late stages of the RP supposed toxic effects of inflammatory factors on the cells of the inner ear.

In ultrastructural study been shown that the morphological changes of the tympanic membrane in particular include disorders in the construction of the outer epithelium, forming epithelial cones, atrophy of the basal membrane of the eardrum and the lack of separate layers of circular and longitudinal collagen fibers. Ultrastructural changes in the eardrum suggest intensification of processes: inflammation, epithelial migration, destruction of collagen fibers and autophagy, which indicates the activity of the development process and negates RP as a residue of prior pathology.

The authors are convinced that the results conducted research contributes to a better understanding of the pathogenesis of chronic otitis media with retraction pocket of the tympanic membrane. They can also contribute to the development of methods for the objective assessment of the state of the middle ear and methods of prevention and conservative treatment of chronic otitis media with retraction pocket.