

IMUNOHISTOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE STEČENOG HOLESTEATOMA SREDNJEG UHA U KORELACIJI S PATOMORFOLOŠKIM PROMJENAMA PALATINALNIH TONZILA

IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF ACQUIRED MIDDLE EAR CHOLESTEATOMA CORRELATED WITH PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN THE PALATINE TONSILS

Dalibor Vranješ^{*†}, Mirjana Gnjatić^{*†}, Aleksandra Aleksić^{*†}, Zorica Novaković[†], Daliborka Tadić^{*‡}, Olivera Ljuboja^{*§}, Biljana Banjac^{*§}

Sažetak

Cilj: ova studija je imala za cilj da ispita i uporedi nivoe ekspresije faktora nekroze tumora alfa receptora-2 (TNF-R2), interleukina-1 (IL-1) i matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) kod hroničnog otitis media (HOM), sa i bez stečenog holesteatoma (SH) i istraži njihovu korelaciju sa patomorfološkim karakteristikama palatinalnih tonzila. **Metode:** uključeno je ukupno 178 ispitanika hirurški tretiranih zbog HOM. Ispitanici su podijeljeni u dvije grupe na osnovu prisustva ili odsustva SH srednjeg uha: 97 s holesteatomom (HHOM) i 81 bez holesteatoma (HOM). Nivoi ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 su ispitani imunohistohemijskom analizom intraoperativno dobijenih tkivnih uzoraka i upoređeni sa morfološkim i kliničkim karakteristikama palatinalnih tonzila. **Rezultati:** tonzilektomirani ispitanici u HHOM grupi (17.5%) pokazuju značajno ($p < 0.05$) veću učestalost u odnosu na ispitanike HOM (7.4%) grupe. Prisustvo SH u odnosu na nivoe ekspresije TNF-R2 ima prediktivni uticaj ($p < 0.05$) na sprovedene tonzilektomije kod ispitanika u HHOM grupi. Prisustvo SH u odnosu na nivoe ekspresije IL-1 ima prediktivni uticaj ($p < 0.05$) na pojavu hipertrofičnog tipa hroničnog tonzilitisa. Kod 155 (87%) ispitanika, distribucija veličine palatinalnih krajnika pokazala je najveću učestalost među onima sa gradusom 0 (48.4%) i 2 (27.1%). **Zaključak:** nivoi ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 u tkivu sh srednjeg uha mogu poslužiti kao značajni prediktori indikacije za tonzilektomiju. Nivoi ekspresije IL-1 u tkivu sh srednjeg uha mogu uticati na pojavu hroničnog hipertrofičnog tonzilitisa. **Glavne riječi:** holesteatom, interleukin-1, matriks metaloproteinaza 9, palatinalne tonzile, receptor 2 faktora nekroze tumora alfa

UVOD

Holesteatom se definiše kao cistična, ekspanzivna lezija temporalne kosti, koja se sastoji iz višeslojnog pločastog epitela s deskvamiranim keratinom, čiju glavnu osobinu karakteriše progresivan rast s destrukcijom okolne kosti zbog efekta pritiska i aktivacije osteoklasta s potencijalnim nastankom po život opasnih intrakranijalnih komplikacija [1, 2]. Izvršena je opšta klasifikacija holesteatoma na kongenitalni, koji se javlja u 2-4% slučajeva i

stečeni. Godišnja incidenca stečenog holesteatoma (SH) srednjeg uha iznosi 3 na 100.000 kod dječije i 9,2 na 100.000 kod odrasle populacije s predominacijom muškog pola [3-5].

Centralno mjesto u patogenezi SH i hroničnog upalnog procesa srednjeg uha zauzimaju medijatori inflamacije, koji uključuju proteine, peptide, glikoproteine, citokine, metabolite arahidonske kiseline, azot-monoksid i slobodne radikale kiseonika. Ova



jedinjenja proizvode epitelne i endotelne ćelije, kao i infiltrirajuće inflamatorne ćelije [6-8]. Inflamatorno uzrokovana epitelna proliferacija je povezana s povećanom ekspresijom litičkih enzima i citokina uključujući arahidonsku kiselinu, intercelularni adhezivni molekul (eng. ICAM - intercellular adhesion molecules), receptorski aktivator za nuklearni faktor kB ligand (eng. RANKL - Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), interleukin-1, -2 i -6 (eng. IL -Interleukin), matriks metaloproteinaze -2 i -9 (eng. MMP - matrix metalloproteinase), kao i faktor nekroze tumora-alfa (eng. TNF- α - tumor necrosis factor alpha), koji su djelomično indukovani bakterijskim antigenima, uključujući endotoksine kao što su lipopolisaharidi [3, 9, 10].

Pregledom dostupne domaće i strane literature i pretraživanjem naučnih baza podataka, nisu pronađene posebno brojne studije koje su ispitivale povezanost stepena ekspresije pojedinih medijatorna inflamacije kod SH i hronične upale srednjeg uha s morfološkim i kliničkim karakteristikama palatinalnih tonzila. Komorowska i saradnici, proučavajući citokine, lokalno produkovane od strane limfocita, izolovanih iz hipertrofičnih nazofaringealnih i palatinalnih tonzila, dokazuju visoku koncentraciju IL-2, IL-4, IL-5, TNF- α i IFN- γ u kulturama ćelija palatinalnih tonzila, u odnosu na ćelije faringealne tonzile. Autori ukazuju na predominaciju celularnog imunog odgovora (Th1) u tkivu palatinalnih tonzila [11]. Studija koja je istraživala ulogu MMP kod rekurentnog tonzilitisa dokazala je da su MMP-7 i MMP-9 glavni promotori ekstracelularnog matriksa koji reaguju na upalne promjene u tonzilarnom tkivu [12]. Kim i saradnici pronalaze visok stepen ekspresije pojedinih medijatora upalnog odgovora (TNF- α , IL-6, IL-1 α) kod ispitanika s tonziloadenoidnom hipertrofijom i opstruktivnom *sleep apnea*-om, čime se podržava hipoteza po kojoj povećani lokalni i

sistemski upalni odgovor podstiču tonzilarnu proliferaciju, dok Passali i saradnici tvrde da visoke tkivne koncentracije pojedinih citokina (TNF- α , IL-1, IL-6) dugoročno slabe imunološku aktivnost i izazivaju hronične i rekurentne inflamatorne procese [13, 14].

Cilj istraživanja je bio da se ispituju i uporede nivoi ekspresije receptora 2 faktora nekroze tumora-alfa (TNF-R2), interleukina-1 (IL-1) i matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) kod hroničnog otitis media (HOM), sa i bez SH u korelaciji s patomorfološkim karakteristikama palatinalnih tonzila.

METODE

Imunohistohemijska studija je uključila 178 ispitanika oba pola, od 5 do 75 godina, koji su podvrgnuti mikrohkirurškom liječenju HOM u Klinici za bolesti uha, grla i nosa, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske, Banjaluka, od 2015. do 2018. godine. Studiju je odobrio Etički odbor UKC RS (br.: 01-10566-2/13). Ispitanici su podijeljeni u dvije grupe na osnovu prisustva ili odsustva SH: 97 (HHOM) i 81 (HOM). Dijagnoza oboljenja je zasnovana na istoriji bolesti, kliničkom pregledu ispitanika i dodatnim dijagnostičkim procedurama. Primjenjene su zatvorene i otvorene tehnike timpanoplastike s modifikacijama.

Klinička procjena veličine palatinalnih tonzila je kategorisana prema "skali 0-4" [15]: Gradus 0: palatinalne tonzile unutar tonzilarnog jame, Gradus 1: palatinalne tonzile opstruišu < 25% isthmus faucium-a, Gradus 2: palatinalne tonzile opstruišu 26 do <50% isthmus faucium-a, Gradus 3: palatinalne tonzile opstruišu 51 do <75% isthmus faucium-a, Gradus 4: palatinalne tonzile opstruišu više od 75% isthmus faucium-a. Ispitani su i upoređeni nivo ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 kod ispitanika obje grupe u korelaciji s morfološkim karakteristikama palatinalnih tonzila i tipovima hroničnog upalnog procesa tonzilarnog tkiva (hronični atrofični i hronični hipertrofični tonzilitis).



Uključeni su ispitanici s dijagnostikovanim HOM sa i bez SH, koji su upućeni na operaciju srednjeg uha. Pacijenti s kongenitalnim holesteatomom, malignim tumorom srednjeg uha, upalom spoljašnjeg uha, prethodnom istorijom operacije uha, kao i uzorci holesteatoma bez perimatriksa, bili su isključeni iz studije. Uzorci dobijeni tokom mikrohiruske procedure su fiksirani u 10% formalinu, a potom ukalupljeni u parafinske blokove iz kojih su dobijeni semiserijski rezovi debljine 4 μ m. Nakon deparafinizacije, uzorci su bojeni rutinskom hematoksilin-eozinom metodom, a zatim analizirani pod svjetlosnim mikroskopom. Uzorci su tretirani s citratnim puferom zagrijavanjem u mikrotalasnoj pećnici tokom 20 minuta radi demaskiranja antigena. Nakon blokade endogene peroksidaze hidrogen peroksidom u metanolu, uzorci su ispirani u Tris Bufered Saline (TBS) rastvoru s pH 7,6.

Imunohistohemijska analiza

Za imunohistohemijsku analizu MMP-9 u uzorcima perimatriksa holesteatoma i inflamirane sluznice kavuma timpani, korišteno je mišje anti-MMP9 monoklonalno antitijelo (MMP9 Monoclonal Antibody, Clone 2C3, Product# MA1-12894, Invitrogen, Thermo Fisher, USA). Imunohistohemijska identifikacija ispitivanih medijatora sprovedena je primjenom EnVision tehnike. Kao hromogeni supstrat je korišten 3,3'-diaminobenzine (DAB), dok je kontrastiranje izvršeno s hematoksilinom. Imunohistohemijska analiza je izvođena ručno u nadležnoj laboratoriji Zavoda za kliničku patologiju. Primjenjivani su originalni reagensi.

U imunohistohemijski obrađenim uzorcima su posmatrani intenziteti ekspresije u svakom pojedinom uzorku, dok je analiza imunohistohemijskih reakcija bazirana na kvantitativnom (0-odsutan, 1-prisutan) i semikvantitativnom određivanju intenziteta ekspresije putem svjetlosnog mikroskopa sistemom gradacije od 0-3 (0-odsutan, 1-slab, 2- umjeren, 3-visoki intenzitet).

U odnosu na postotak obojenih ćelija izvršena je podjela u 4 kategorije. Rezultati su smatrani negativnim, ako nije bilo obojenja i označeni su s 0, slabo pozitivnim kod $\leq 25\%$ pozitivnih ćelija uz oznaku 1, umjereno pozitivnim kod $\geq 25-50\%$ pozitivnih ćelija uz oznaku 2, a visoko pozitivnim uz oznaku 3, ako je bilo prisutno $\geq 50\%$ pozitivnih ćelija. Određivanje ukupnog rezultata imunohistohemijske reakcije je izračunato na osnovu proizvoda rezultata intenziteta ekspresije i postotka obojenih ćelija. Ukupni rezultati analize su smatrani negativnim kod $R \leq 1$ i označeni su s 0 (Slika 1), slabo pozitivni kod $R \geq 2 \leq 3$ uz oznaku 1+, umjereno pozitivni kod $R \geq 4 \leq 6$ uz oznaku 2+, a jako pozitivni kod $R = 9$ uz oznaku 3+.

Statistička analiza

Podaci su analizirani na nivou deskriptivne statistike, računanjem apsolutnih i relativnih distribucija ispitanika kontrolnog i tkiva SH, sa nivoima ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 u odnosu na posmatrane faktore, te računanjem aritmetičke sredine i standardne devijacije za dob pacijenata. Za potrebu izračunavanja razlike u distribuciji ispitanika HOM i HHOM grupe, korišten je Pirsonov χ^2 -test, a za računanje razlika u dobi ispitanika između grupa Mann-Whitney U neparametrijski test. Kategorijalna regresija je korištena radi utvrđivanja veze između nezavisnih faktora, prediktora - inflamirane sluznice i holesteatomskog tkiva, ispitivanog medijatora sa morfološkim i kliničkim karakteristikama palatinalnih tonzila. Rezultati su smatrani značajnim ako je $p < 0,05$. Statistička obrada podataka je sprovedena korištenjem alata za obradu podataka SPSS verzija 21.0 (IBM, USA).



REZULTATI

Istraživanje je obuhvatilo 178 ispitanika, od kojih je 95 (53.4%) pripadalo muškom, a 83 (46.6%) ženskom polu. Prosječna starosna dob u ukupnom uzorku je iznosila 49.11 godina ($SD \pm 17.06$), pri čemu je najmlađi ispitanik imao 5, a najstariji 75 godina. Orofaringoskopskim pregledom ukupnog uzorka, kod 155 (87.1%) ispitanika je uočeno prisustvo palatinalnih tonzila, dok je 23 (12.9%) ispitanika bilo tonzilektomirano. Primjenom χ^2 testa utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0.05$) u procentualnoj distribuciji ispitanika HHOM i HOM grupe prema nalazu orofaringoskopije, gdje su tonzilektomirani ispitanici HHOM (17.5%) pokazali značajno veću učestalost u odnosu na ispitanike HOM (7.4%) grupe (Tabela 1).

Kategorijalna regresija koja je obuhvatala varijable "HHOM/HOM grupa" i rezultate ekspresije TNF-R2 i MMP-9, pokazala je da prisustvo SH ima statistički prediktivni uticaj na orofaringoskopski nalaz palatinalnih tonzila, pri čemu postoji veća vjerovatnoća da su ispitanici HHOM grupe tonzilektomirani (Tabela 2, 3). Kategorijalna regresija koja je obuhvatala varijable "HHOM/HOM grupa" i rezultate ekspresije IL-1, nije pokazala statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji uticaja na orofaringoskopski nalaz palatinalnih tonzila.

Po pitanju distribucije ispitanika prema tipu hroničnog tonzilitisa, zastupljenost ispitanika s atrofičnim (49.7%) i hipertrofičnim (50.3%) tipom je bio relativno izbalansiran. Ispitanici s atrofičnim (57.3%) tipom hroničnog tonzilitisa su bili najzastupljeniji u HOM grupi, a s hipertrofičnim (57.5%) u HHOM grupi. Iako je bila relativno niska, razlika između obje grupe po pitanju tipa hroničnog tonzilitisa se nije pokazala statistički značajnom ($p = 0.06$) (Tabela 4). Kategorijalna regresija koja je obuhvatala varijable "HHOM/HOM grupa" i rezultate ekspresije IL-1, pokazala je da prisustvo SH

ima statistički prediktivni uticaj na vjerovatnoću da će ispitanici imati hipertrofični tip hroničnog tonzilitisa (Tabela 5). Kategorijalna regresija, koja je obuhvatala varijable "HHOM/HOM grupa" i rezultate ekspresije TNF-R2 i MMP-9 ekspresije, nije pokazala statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji uticaja na tip hroničnog tonzilitisa.

Od 155 (87%) ispitanika koji nisu tonzilektomirani, najveću učestalost su pokazali ispitanici (48.4%) s gradusom 0 (palatinalne tonzile unutar tonzilarnih jame) i ispitanici (27.1%) s gradusom 2 (palatinalne tonzile opstruišu 26 do $< 50\%$ isthmus faucium-a). Statističkom analizom razlike broja ispitanika prema gradusima veličine palatinalnih tonzila nije utvrđena statistička značajnost (Tabela 6). Ordinalna regresija, koja je obuhvatala varijable "HHOM/HOM grupa" i rezultate ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9, nije pokazala statistički značajan doprinos nijednog od faktora u predikciji uticaja na veličinu palatinalnih tonzila.

DISKUSIJA

Po pitanju orofaringoskopskog nalaza palatinalnih tonzila, utvrđena je statistički značajna razlika između obje grupe, gdje su tonzilektomirani ispitanici u HHOM grupi (17.5%) pokazali statistički značajno veću učestalost u odnosu na ispitanike kontrolne HOM grupe (7.4%). Kod ispitanika obje grupe s prisustvom tonzilarnog tkiva, zabilježena je visoka ekspresija TNF-R2 i IL-1. Po pitanju ekspresije MMP-9 u HHOM grupi su najveću učestalost pokazali ispitanici s visokopozitivnom, a u HOM grupi s negativnom ekspresijom. Prediktorski model, koji je obuhvatao prisustvo SH i rezultate ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9, pokazao je da postoji značajno veća vjerovatnoća odsustva palatinalnih tonzila ili sprovedenih tonzilektomija u prisustvu SH.



Iako je bila relativno niska, razlika između obje grupe po pitanju tipa hroničnog tonzilitisa se nije pokazala statistički značajnom. Ispitanici s hipertrofičnim tipom (57.5%) su bili najzastupljeniji u HHOM grupi, a s atrofičnim (57.3%) u HOM grupi. Kod ispitanika obje grupe s hipertrofičnim i atrofičnim tipom hroničnog tonzilitisa dokazana je visoka ekspresija TNF-R2 i IL-1. Ispitanici s hipertrofičnim tipom u eksperimentalnoj HHOM grupi su imali visoku, a s atrofičnim negativnu ekspresiju MMP-9. U HOM grupi je kod oba tipa hroničnog tonzilitisa zabilježena negativna ekspresija MMP-9. U odnosu na rezultate ekspresije IL-1, prisustvo SH je imalo statistički značajan prediktivni uticaj za prisustvo hipertrofičnog tipa hroničnog tonzilitisa.

U odnosu na kliničku procjenu veličine palatinalnih tonzila, najveću učestalost su pokazali ispitanici s gradusom 0 (48.4%) i 2 (27.1%). Razlika u distribuciji ispitanika obje grupe u odnosu na stepen veličine palatinalnih tonzila se nije pokazala statistički značajnom. Kod ispitanika s gradusom 0 i 2 u obje grupe je dokazana visoka ekspresija TNF-R2 i IL-1. Sličan rezultat je zabilježen kod ispitanika obje grupe s gradusom 2 kod kojih je uočena visoka ekspresija MMP-9, za razliku od grupe s gradusom 0. Prisustvo SH i rezultati ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 nisu imali statistički značajan prediktivni uticaj po pitanju veličine palatinalnih tonzila.

Harabuchi, istražujući vrlo kompleksnu korelaciju poremećaja Waldeyer-ovog limfatičnog prstena i srednjeg uha, ističe značaj signalizacije TLR1 receptora u indukciji tkiva nazofaringealne i palatinalne tonzile da proizvode proinflamatorne citokine, hemokine i prirodne antimikrobne molekule koje imaju ključnu ulogu u razvoju hronične upale srednjeg uha [16]. Hoefakker i saradnici pronalaze u ekstrapolikularnom području humanih palatinalnih tonzila specifične ćelije koje proizvode pojedine citokine i antitijela. Autori

dokazuju da makrofagi proizvode IL-1 α i TNF- α , a T ćelije interdigitirajuće dendritske ćelije (eng. IDC - Interdigitating dendritic cells), IL-2, IL-4 i IFN- γ [17]. U sličnom istraživanju, Andersson i saradnici pronalaze da intraepitelne T ćelije u vanfolikularnom prostoru mogu proizvesti veću količinu citokina IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α i TNF- β , dok prisustvo pojedinih citokina, poput IL-8 i IL-1 α dokazuju samo u epitelu tonzilarnih kripti [18]. Zelazowska-Rutkowska i saradnici su dokazali značajnu produkciju IL-5 i TNF- α u ćelijama faringealne tonzile kod ispitanika s hroničnom upalom srednjeg uha u komparaciju s grupom ispitanika s hipertrofijom faringealne tonzile [19].

Passali i saradnici u svojoj studiji identifikuju visoke tkivne koncentracije TNF- α , IL-1 β i IL-6 kao odraz lokalne prekomjerne produkcije od aktiviranih monocita i makrofaga, ponovnim stimulacijama patogenih agensa. Autori navode da visoki nivoi ispitivanih citokina, dugoročno slabe imunološku aktivnost i izazivaju štetne efekte. Hroničnu upalnu bolest, na nivou palatinalnih tonzila, s makroskopskog aspekta, u dječjoj dobi karakteriše hiperplazija i hipertrofija, dok je za odraslu dob češće prisutna skleroza tonzilarnog tkiva [14]. Povećana produkcija T limfocita s ekspresijom IL-7R (CD127 i CD132) u hipertrofičnoj faringealnoj tonzili utiče na količinu limfocita i remeti imunološku funkciju tonzila što može utjecati na tok hronične upale srednjeg uha [20]. Hiperproliferacija povezana s ekspresijom keratina je dokazana u suprabazalnim slojevima SH u odnosu na ekspresiju epitela normalne kože i palatinalne tonzile što podupire tezu o hiperproliferativnom karakteru epitela SH [21].

Buduća istraživanja bi se trebala bazirati na identifikaciji proinflamatornih citokina u sekundarnim limfnim organima i temeljnijem proučavanjem njihove povezanosti s hroničnim upalnim procesom srednjeg uha i SH.



ZAKLJUČAK

Nivoi ekspresije TNF-R2, IL-1 i MMP-9 u tkivu SH srednjeg uha mogu poslužiti kao značajni prediktori indikacije za tonzilektomiju. Nivoi ekspresije IL-1 u tkivu SH srednjeg uha mogu uticati na pojavu hipertrofičnog hroničnog tonzilitisa.

Sukob interesa

Autori izjavljuju da nemaju sukob interesa.

LITERATURA

- Meyer TA, Strunk Jr CL, Lambert PR. Cholesteatoma. In: Bailey BJ, Johnson JT, Newlands SD, eds. Head and Neck surgery-Otolaryngology, 4th edn. Lippincott Williams and Wilkins; 2083-91. ISBN: 0781755611
- Kotowski M, Adamczyk P, Szydlowski J. Micro RNAs and Circular RNAs in Different Forms of Otitis Media. *Int J Mol Sci* 2023;24(7):6752. doi: 10.3390/ijms24076752.
- Ayyaril NA, Chirukandath Jayasankaran S, Menon U, Moorthy S. Role of Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging in the Evaluation of Clinically Suspected Cholesteatoma Cases. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 2022;74(1):719-723. doi: 10.1007/s12070-021-02526-8.
- Frickmann H, Zautner AE. Cholesteatoma-A Potential Consequence of Chronic Middle Ear Inflammation. *Otolaryngology: Current Research* 2012;5:1-8. doi:10.4172/2161-119X.S5-001.
- Bennett M, Warren F, Jackson GC, Kaylie D. Congenital cholesteatoma: theories, facts, and 53 patients. *Otolaryngol Clin North Am* 2006;39:1081-94. doi: 10.1016/j.otc.2006.08.001.
- Kuo CL. Etiopathogenesis of acquired cholesteatoma: prominent theories and recent advances in biomolecular research. *Laryngoscope* 2015;125(1):234-40. doi: 10.1002/lary.24890.
- Boesoirie SF, Hasansulama W, Lasminingrum L, Novianto AT, Gatera VA, Aroeman NA, et al. The Role of Vitamins A and E Level in Chronic Suppurative Otitis Media with and without Cholesteatoma. *J Multidiscip Healthc* 2023;16:3435-3442. doi: 10.2147/JMDH.S414115.
- Juhn SK, Jung MK, Hoffman MD, Drew BR, Preciado DA, Sausen NJ, et al. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of otitis media and sequelae. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2008;1:117-38. doi: 10.3342/ceo.2008.1.3.117.
- Yang F, Jia Y, Sun Q, Zheng C, Liu C, Wang W, et al. Raloxifene improves TNF- α -induced osteogenic differentiation inhibition of bone marrow mesenchymal stem cells and alleviates osteoporosis. *Exp Ther Med* 2020;20(1):309-314. doi: 10.3892/etm.2020.8689.
- Milewski C. Role of perimatrix fibroblasts in development of acquired middle ear cholesteatoma. A hypothesis. *HNO*. 1998;46:494-501. doi: 10.1007/s001060050257.
- Komorowska A, Komorowski J, Banasik M, Lewkowicz P, Tchorzewski H. Cytokines locally produced by lymphocytes removed from the hypertrophic nasopharyngeal and palatine tonsils. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2005;69(7):937-41. doi: 10.1016/j.ijporl.2005.01.035.
- Babakurban ST, Erbek SS, Terzi YK, Arslan F, Sahin FI. Fractalkine receptor polymorphism and chronic tonsillitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2014;271(7):2045-8. doi: 10.1007/s00405-014-2908-7.
- Kim J, Bhattacharjee R, Dayyat E, Snow AB, Kheirandish-Gozal L, Goldman JL, et al. Increased cellular proliferation and inflammatory cytokines in tonsils derived from children with obstructive sleep apnea. *Pediatr Res*. 2009;66(4):423-8. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181b453e3.
- Passali D, Damiani V, Passali GC, Passali FM, Boccazzi A, Bellussi L. Structural and immunological characteristics of chronically inflamed adenotonsillar tissue in childhood. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11(6):1154-7.



- doi: 10.1128/CDLI.11.6.1154-1157.2004.
15. Brodsky L. Modern assessment of tonsils and adenoids. *Pediatr Clin N Am* 1989;36:1551-69. doi: 10.1016/s0031-3955(16)36806-7.
 16. Harabuchi Y, Takahara M. Recent advances in the immunological understanding of association between tonsil and immunoglobulin A nephropathy as a tonsil-induced autoimmune/inflammatory syndrome. *Immun Inflamm Dis* 2019;7(2):86-93. doi: 10.1002/iid3.248.
 17. Hoefakker S, Van 't Erve EH, Deen C, Van den Eertwegh AJ, Boersma WJ, Notten WR, et al. Immunohistochemical detection of co-localizing cytokine and antibody producing cells in the extrafollicular area of human palatine tonsils. *Clin Exp Immunol* 1993;93(2):223-8. doi: 10.1111/j.1365-2249.1993.tb07970.x.
 18. Chen VG, Fonseca VMGD, Amaral JB, Camargo-Kosugi CM, Moreira G, Kosugi EM, et al. Inflammatory markers in palatine tonsils of children with obstructive sleep apnea syndrome. *Braz J Otorhinolaryngol* 2020;86(1):23-29. doi: 10.1016/j.bjorl.2018.08.001.
 19. Zelazowska-Rutkowska B, Wysocka J, Ratomski K, Kasprzycka E, Skotnicka B. Increased percentage of T cells with the expression of CD127 and CD132 in hypertrophic adenoid in children with otitis media with effusion. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2012;269(7):1821-5. doi: 10.1007/s00405-012-1977-8.
 20. Zelazowska-Rutkowska B, Ilendo E, Skotnicka B, Wysocka J, Kasprzycka E. Production of cytokines by mononuclear cells of hypertrophic adenoids in children with otitis media with effusion. *Folia Histochem Cytobiol* 2012;50(4):586-9. doi: 10.5603/20326.
 21. Bujía J, Schilling V, Holly A, Stammberger M, Kastenbauer E. Hyperproliferation-associated keratin expression in human middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol* 1993;113(3):364-8. doi: 10.5603/20326. doi: 10.3109/00016489309135826



PRILOG:

Tabela 1. Ispitanici prema orofaringoskopskom nalazu palatinalnih tonzila

			Grupa		Ukupno
			HHOM	HOM	
Orofaringoskopski nalaz palatinalnih tonzila	Prisutne	N	80	75	155
	palatinalne tonzile	%	82.5%	92.6%	87.1%
	Tonzilektomiran/a	N	17	6	23
		%	17.5%	7,4%	12.9%
Ukupno		N	97	81	178
		%	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-square test: $\chi^2=4.02$, $p=0.045$; $p<0.05$; HHOM-hronični otitis media s holesteatomom; HOM-hronični otitis media

Tabela 2. Ekspresija receptora 2 faktora nekroze tumora alfa i orofaringoskopski nalaz palatinalnih tonzila

	Standardni koeficijenti		df	F	P
	Beta	S.E.			
Grupa	,155	,066	1	5.511	,020*
TNF-R2	-,143	,110	2	1.697	,186

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

Tabela 3. Ekspresija matriks metaloproteinaze 9 i orofaringoskopski nalaz palatinalnih tonzila

	Standardni koeficijenti		df	F	p
	Beta	S.E.			
Grupa	,162	,071	1	5.216	,024*
MMP-9	-,081	,094	2	,737	,480

** $p<0.05$, MMP-9 - matriks metaloproteinaza 9, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - broj stepeni slobode, F - test omjera varijanse*

**Tabela 4.** Ispitanici prema tipu hroničnog tonzilitisa

			Grupa		Ukupno
			HHOM	HOM	
Tip hroničnog tonzilitisa	Atrofični	N	34	43	77
		%	42.5%	57.3%	49.7%
	Hipertrofični	N	46	32	78
		%	57.5%	42.7%	50.3%
Ukupno		N	80	75	155
		%	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-square test: $\chi^2=3.41$, $p=0.06$; HHOM-hronični otitis media s holesteatomom; HOM- hronični otitis media

Tabela 5. Ekspresija interleukina 1 prema tipu hroničnog tonzilitisa

	Standardni koeficijenti		df	F	P
	Beta	S.E.			
Grupa	,176	,081	1	4.767	,031*
IL-1	,113	,127	2	,787	,457

* $p<0.05$, IL-1 - interleukin – 1, B - koeficijent za konstantu, S.E. - standardna greška, df - broj stepeni slobode, F - test omjera varijanse

Tabela 6. Ispitanici prema veličini palatinalnih tonzila

			Grupa		Ukupno
			HHOM	HOM	
Klinička procjena veličine palatinalnih tonzila	Gradus 0: palatinalne tonzile unutar tonzilarne jame	N	33	42	75
		%	41.3%	56.0%	48.4%
	Gradus 1: palatinalne tonzile opstruišu < ,=25% isthmus-a	N	15	10	25
		%	18.8%	13.3%	16.1%
	Gradus 2: palatinalne tonzile opstruišu 26 do <50% isthmus-a	N	24	18	42
		%	30.0%	24.0%	27.1%
	Gradus 3: palatinalne tonzile opstruišu 51 do <75% isthmus-a	N	8	5	13
		%	10.0%	6.7%	8.4%
Ukupno		N	80	75	155
		%	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-square test: $\chi^2=3.47$, $p=0.34$; HHOM-hronični otitis media s holesteatomom; HOM- hronični otitis media



Summary

Aim: this study aimed to examine and compare the levels of expression of tumor necrosis factor alpha receptor-2 (TNF-R2), interleukin-1 (IL-1) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in chronic otitis media (COM), with and without AC and their correlation with pathomorphological characteristics of palatine tonsils. **Methods:** a total of 178 patients undergoing surgery for com were included. The patients were categorized into two groups based on the presence or absence of AC: 97 with cholesteatoma (CCOM) and 81 without cholesteatoma (COM). Expression levels of TNF-R2, IL-1 and MMP-9 were examined by immunohistochemical analysis of tissue samples obtained intraoperatively and compared with morphological and clinical characteristics of the palatine tonsils. **Results:** patients who underwent tonsillectomy in the ccom group (17.5%) show a significantly ($p < 0.05$) higher frequency compared to patients from the com (7.4%) group. The presence of ac in relation to the level of TNF-R2 expression has a predictive effect ($p < 0.05$) on tonsillectomy performed in patients in the CCOM group. The presence of AC in relation to the level of IL-1 expression has a predictive influence ($p < 0.05$) on the presence of hypertrophic type of chronic tonsillitis. In 155 (87%) patients, the distribution of palatal tonsil size revealed the highest frequencies among those with grades 0 (48.4%) and 2 (27.1%). **Conclusions:** expression levels of TNF-R2, IL-1, and MMP-9 in AC tissue of the middle ear may serve as significant predictors of the indication for tonsillectomy. Expression levels of IL-1 in ac tissue of the middle ear can influence the occurrence of hypertrophic chronic tonsillitis. **Keywords:** cholesteatoma, interleukin-1, matrix metalloproteinase 9, palatine tonsils, tumor necrosis factor alpha receptor-2

Autor za korespondenciju:

Doc. dr sc. med. Dalibor Vranješ,

Klinka za bolesti uha, grla i nosa, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske, Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

12 beba bb, 78000 Banja Luka,

Telefon: +387 51 342 666 Fax: +387 51 342 663

e-mail: dalibor.vranjes@yahoo.com

*Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina,

†Klinika za bolesti uha, grla i nosa, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske, Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

‡Klinika za neurologiju, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske, Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

§Klinika za dječije bolesti, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske, Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina