

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Ana D. Jotić

***Značaj ekspresije i polimorfizama receptora sličnih  
Toll-u 2 i 4 u zapaljenskim oboljenjima srednjeg  
uva i njihovim komplikacijama***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE

Ana D. Jotic

*Importance of expression and polymorphisms of  
Toll-like receptors 2 and 4 in inflammatory diseases  
of the middle ear and its complications*

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2014.

Mentor: Prof. Dr Snežana Ješić, otorinolog, redovni profesor Katedre za otorinologiju i maksilofacijalnu hirurgiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komentor: Aleksandra Stanković, Viši naučni saradnik u Laboratoriji za Radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke, Vinča u Beogradu

Članovi Komisije:

1. Prof. Dr Vojko Đukić, otorinolog, redovni profesor Katedre za otorinologiju i maksilofacijalnu hirurgiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. Dr Rade Kosanović, otorinolog, redovni profesor Katedre za otorinologiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. Dr Jovica Milovanović, otorinolog, vanredni profesor na Katedri za otorinologiju sa maksilofacijalnom hirurgijom Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
4. Prof. Dr Milan Jovanović, otorinolog, vanredni profesor na Katedri za otorinologiju sa maksilofacijalnom hirurgijom Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
5. Doc. Dr Nada Tomanović, patolog, docent na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

## **SADRŽAJ**

SAŽETAK.....	2
ABSTRACT.....	4
UVOD.....	6
Početni imunski odgovor i receptori slični Toll-u.....	10
<i>MyD88-zavistan signalni put</i> .....	14
<i>MyD88-nezavistan signalni put</i> .....	14
Endogeni ligandi.....	17
Aktiviranje TLR-a od strane gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija.....	17
<i>Toll-u sličan receptor 2</i> .....	18
<i>Toll-u sličan receptor 4</i> .....	18
Uloga TLR2 i TLR4 u infekcijama srednjeg uva na animalnom modelu.....	20
Uloga TLR2 i TLR4 u infekcijama srednjeg uva kod ljudi.....	23
CILJ ISTRAŽIVANJA.....	26
MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA.....	28
Imunohistohemijska analiza tkivnih uzoraka na ekspresiju TLR 2 i 4 antitela.....	30
Detekcija i analiza polimorfizma u genima za TLR 2 i TLR 4.....	31
Mikrobiološka analiza.....	33
Statistička analiza.....	33
REZULTATI.....	34
DISKUSIJA.....	70
ZAKLJUČAK.....	79
LITERATURA.....	82
BIOGRAFIJA.....	94
SPISAK SKRAĆENICA.....	96

***Značaj ekspresije i polimorfizama receptora sličnih Toll-u 2 i 4 u zapaljenskim oboljenjima srednjeg uva i njihovim komplikacijama***

**Ana D. Jotić**

***SAŽETAK***

***Uvod:*** Receptori slični toll-u (eng. Toll like receptors, TLR) imaju bitnu ulogu u aktivaciji početnog imunskog odgovora. Svaki opisani TLR prepoznaje određene mikrobiološke strukture ili molekulske obrasce patogena (eng. pathogen-associated molecular patterns, PAMP) i vezuje specifične ligande. Smatra se da je regulacija ekspresije TLR ima ulogu u patogenezi hroničnog otitisa, i da polimorfizmi u genima za TLR 2 i TLR4 mogu biti asocirani sa podložnošću akutnom otitisu i sekretornom hroničnom otitisu. Ova studija je imala za cilj da utvrdi postojanje ekspresije TLR2 i 4 na izmenjenoj sluznici srednjeg uva kod različitih formi hroničnih otitisa, kao i uticaj polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2 i polimorfizma Thr399Ile u genu za TLR4 i prisustvo bakterija na intenzitet početnog imunskog odgovora.

***Matrijal i metod istraživanja:*** Ova studija preseka je sprovedena na Klinici za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju Kliničkog centra Srbije; Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Laboratoriji za Radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke Vinča u Beogradu, Univerziteta u Beogradu, u periodu od januara 2010.do decembra 2013 godine. Svi ispitanici su lečeni na Klinici za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju Kliničkog Centra Srbije. Kontrolna grupa za ispitivanje ekspresije gena i proteina na sluznici srednjeg uva obuhvatila je 10 uzoraka makroskopski zdrave sluznice uzetih sa različitih delova srednjeg uva pacijenata lečenih od otoskleroze, kao nezapaljenskog procesa.. Kontrolna grupa za ispitivanje polimorfizama DNK obuhvatila je 100 uzoraka pune krvi pacijenata. Eksperimentalna grupa je obuhvatila uzorke tkiva i pune krvi 85 ispitanika; 45 (15 dece i 30 odraslih) operativno lečenih zbog hroničnog supurativnog otitisa bez holesteatoma; 30 (10 dece i 20 odraslih) zbog hroničnog otitisa sa holesteatomom; 10 bolesnika sa komplikacijama otitisa. Ekspresija proteina TLR 2 i TLR 4 se utvrđivala imunohistohemijskom metodom primenom

specifičnih TLR 2 i TLR4 antitela. Detekcija i analiza polimorfizama DNK gena za TLR2 i TLR4 (Arg753Gln i Thr399Ile) je urađena analizom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (eng. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP).

**Rezultati:** Starosna dob pacijenta nije uticala ni na pojavu komplikacija kod hroničnih otitisa, niti na ekspresiju TLR2 i TLR4 u patološki izmenjenoj sluznici srednjeg uva kod pacijenata sa HOM. Javljanje komplikacija kod pacijenata uključenih u studiju nije zavisilo od starosti pacijenta, od vrste bakterijskog uzročnika, učestalosti polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2 i polimorfizma Thr399Ile u genu za TLR4, kao ni od ekspresije TLR2 i TLR4 na patološki izmenjenoj sluznici srednjeg uva. Vrsta izolovanog bakterijskog uzročnika nije bila povezana sa učestalošću polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2 i polimorfizma Thr399Ile u genu za TLR4, kao ni sa ekspresijom TLR2 i TLR4 na patološki izmenjenoj sluznici srednjeg uva. Učestalost polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2 je značajno veća u eksperimentalnoj grupi pacijenata sa hroničnim otitisom nego u kontrolnoj grupi. Utvrđena je značajna asocijacija polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2 sa različitim patološkim promenama sluznice u okviru grupe hroničnih otitisa bez holesteatoma. Postoji jaka povezanost i zavisnost ekspresije TLR 2 i 4 dokazane imunohistohemijskim bojenjem, i različitih tipova patološki izmenjene sluznice srednjeg uva kod hroničnog otitisa. Imunohistohemijski dokazana ekspresija TLR2 i 4 na sluznici pacijenata eksperimentalne grupe je bila značajno različita u odnosu na kontrolnu grupu, gde ekspresije nije ni bilo ( $p=0,000$ ).

**Zaključak:** Određeni polimorfizmi u genima za TLR mogli bi da ukažu na povećanu podložnost javljanja hroničnog otitisa. Nivo imunohistohemijski dokazane ekspresije TLR 2 i 4 na sluznici srednjeg uva je više zavisila od različitih tipova patoloških promena, nego od tipa bakterijskih uzročnika. Ovo može ukazati da je stepen patološke izmenjenosti direktni indikator aktivnosti TLR-a u srednjem uvu. Ova saznanja mogu promeniti shvatanja o ulozi TLR-a u patogenezi hroničnog otitisa.

**Ključne reči:** Hronični otitis, Toll-u sličan receptor (TLR) 2, TLR4, polimorfizmi

*Importance of expression and polymorphisms of Toll-like receptors 2 and 4 in inflammatory diseases of the middle ear and its complications*

Ana D. Jotić

**ABSTRACT**

**Introduction:** Toll-like receptors (TLRs) have a prominent role in inducing innate immune response. Each of described TLRs recognizes conserved microbial structures or pathogen-associated molecular patterns (PAMP) and has distinct ligands specificities. It has been suggested that regulation of TLRs is involved in the pathogenesis of chronic otitis media, and that TLR2 and TLR 4 polymorphisms were more or less successfully connected with susceptibility to acute otitis and chronic otitis with effusion. In this study, we wanted to establish expression of TLR 2 and 4 on middle ear mucosa in different types of chronic otitis media, and the influence of polymorphisms TLR 2 Arg753Gln and TLR 4 Thr399Ile and bacterial infection on the intensity of innate immune response.

**Material and methods:** This study was conducted on Clinic for Otorhinolaryngology and Maxillofacial surgery, Clinical Centre of Serbia; Institute of Pathology of Medical Faculty in Belgrade and Laboratory for Radiobiology and Molecular Genetics of Vinca Institute of Nuclear Sciences, in the period from January 2010. to December 2013. All patients and control group subjects were treated on Clinic for otorhinolaryngology and maxillofacial surgery, Clinical Centre of Serbia in Belgrade. Control group for mucosal TLR expression consisted of 10 samples of middle ear mucosa taken from patients with otosclerosis. Control group for DNA polymorphism detection consisted of 100 full blood samples in healthy subjects. Experimental group consisted of mucosal tissue samples and full blood samples of 85 patients; 45 treated of chronic otitis without cholesteatoma (15 children and 30 adults), 30 treated of chronic otitis with cholesteatoma (10 children and 20 adults) and 10 patients with complications of chronic otitis media with or without cholesteatoma. Expression of TLR 2 and 4 on middle ear mucosa was determined with immunohistochemical staining.

**Results:** TLR 2 and TLR 4 expression on the middle ear mucosa wasn't influenced by age of the patients with chronic otitis media. The occurrence of otogenic complications in patients included in the study wasn't in correlation with age, type of bacterial infection, TLR 2 Arg753Gln and TLR 4 Thr399Ile polymorphism, and TLR 2 and TLR 4 expression on middle ear mucosa. Specific bacterial infection wasn't in correlation with TLR 2 Arg753Gln and TLR 4 Thr399Ile polymorphism, and TLR 2 and TLR 4 expression on middle ear mucosa. Incidence of TLR 2 Arg753Gln polymorphism is significantly higher in experimental group of patients with chronic otitis media, comparing to control group. Significant association between TLR 2 Arg753Gln polymorphism and different types of pathohistological mucosal changes in patients with chronic otitis media was established. Strong dependence of TLR 2 and TLR 4 expression on middle ear mucosa with different pathohistological inflammatory changes and immunohistochemical activity after staining was detected. TLR 2 and 4 expression on experimental group mucosa were significantly different comparing to control group, where there was no expression ( $p=0,000$ ).

**Conclusion:** Certain mutations in TLR genes could be indicative for susceptibility to chronic otitis media. Expression of TLR2 and 4 on middle ear mucosa was more dependable on different types of mucosal changes and certain type of COM than on bacteria found in the specimens. This can indicate that the degree of mucosal changes is a direct indicator of TLRs activity in middle ear, even more than an infection with specific infective agent. This can stir our understanding of TLRs role in pathogenesis of chronic otitis media in a new future direction.

**Key words:** Chronic otitis media, Toll-like receptor (TLR) 2, TLR4, polymorphism



# ***UVOD***

---

## **UVOD**

Akutna i hronična zapaljenja srednjeg uva predstavljaju aktuelni problem u otorinolaringologiji već decenijama. Saznanja o etiologiji i toku ove bolesti, kao i o načinu lečenja se konstantno menjanju i predmet su mnogih istraživanja. Zapaljenje srednjeg uva predstavlja najčešće oboljenje kod dece, sa izuzetkom virusnih infekcija gorneg respiratornog trakta. U 80% dece od 1 do 16 godina uzrok otitisa je bakterijska infekcija, pa je to i bolest koja je najčešće leči antibioticima. Otitis se zbog svoje visoke incidencije i spontanog oporavka, može se smatrati i delom prirodnog sazrevanja imuniteta kod dece, ukoliko je bez komplikacija. [1] Približno 3-15% svih pacijenata koji boluju od otitisa su odrasle osobe. [2]

Problem zapaljenja srednjeg uva je prvenstveno medicinski, jer bolest može imati veoma težak klinički tok, naročito kod odojčadi i mlađe dece, i dovesti do smrtnog ishoda. Komplikuje se širenjem infekcije u okolna tkiva, dovodeći do mastoiditisa, petrozitisa, paralize facijalnog nerva, labirintitisa, ali i endokranijumskih komplikacija; epiduralnih, subduralnih apscesa, moždanih apscesa i meningitisa. Danas u svetu godišnje umire 50 000 dece od komplikacija otitisa, naročito u nerazvijenim zemljama. [3] Infektivne komplikacije se i dalje dešavaju uprkos široke primene antibiotika, čak i povećavaju zbog njihove nekritične primene i nastanka rezistencije na uzročnike. Neinfektivne sekvele otitisa, kao što su perforacije bubne opne, erozije lanca slušnih košćica i labirinta, timpanoskleroza, glavni su uzročnici slabljenja sluha kod dece, ali i razlozi neadekvatnog razvoja govora i psihomotornog razvoja. Nedostatak adekvatnog i blagovremenog lečenja može da dovede do pojave hroničnih formi otitisa kod osoba svih uzrasta, kao što su hronični supurativni otitisi sa ili bez holesteatoma, ili hronični sekretorni otitisi karakteristični za predškolski uzrast. Ovi oblici obično zahtevaju hiruško lečenje u više navrata i prate osobu tokom celog života ograničavajući svakodnevne aktivnosti, a kasnije utiču na radnu sposobnost i psihofizičko stanje te osobe. Infekcije uva tada postaju i socijalni i ekonomski problem, opterećujući zdravstvene fondove.

Pod terminom hronični otitis media najčešće se podrazumevaju strukturne promene srednjeg uva sa prisutnim ili odsutnim defektom bubne opne u trajanju dužem od 12 nedelja. [4] Najčešće su ove promene posledica dugotrajnog zapaljenja sluznice srednjeg uva, ali to i ne mora da bude slučaj. Forme hroničnog otitisa kod kojih postoji stalna ili povremena otoreja (slivanje

sekreta iz uva) možemo nazvati supurativnim hroničnim otitisima. Nesupurativne forme hroničnog otitisa obuhvataju atelektatični i adhezivni hronični otitis i timpanoskleroza. Supurativne forme hroničnog otitisa mogu se javljati sa ili bez holesteatoma. Pod holesteatom podrazumevamo retrakcioni džep ili cističnu promenu ispunjenu skvamoznim epitelom i keratinskim skvamama koji se javlja u pneumatizovanim prostorima temporalne kosti. Posebna forma hroničnog otitisa je i sekretorni hronični otitis ili hronični otitis sa efuzijom, kako je poznat u stranoj literaturi. Karakteriše se postojanjem gustog sekreta u šupljini srednjeg uva iza intaktne bubne opne duže od 12 nedelja, koji dovodi do konduktivnog oštećenja sluha. Kod supurativnih hroničnih otitisa bez holesteatoma, ponavljane infekcije mukoze srednjeg uva dovode do njenih histoloških promena. Kada zapaljenski proces uđe u svoju hroničnu fazu, dolazi do promene u vrsti zapaljenskih ćelija od leukocita ka mononuklearima kao što su makrofagi, limfociti i plazmociti. [5] Ove ćelije dovode do sekrecije inflamatornih medijatora i faktora rasta, koje dovode do povećane kapilarne propustljivosti, stvaranja edema i hiperemije sluznice srednjeg uva. Granulaciono tkivo se sastoji od vaskularizovanog vezivnog tkiva sa inflamatornim infiltratima. Granulaciono tkivo sazrevanjem prelazi u fibrozno tkivo smanjene vaskularizacije, što dovodi do stvaranja adhezija između osikularnog lanca i bubne opne. Ireverzibilne promene se dešavaju i u dubokom sloju epitela, i obuhvataju subepitelni edem i mukoperiostalnu fibrozu. [6] Ukoliko inflamacija perzistira, razvija se i skleroza kosti zajedno sa formiranjem nove kosti koja prouzrokuje smanjenu pneumatizaciju mastoida.

Uzročnici otitisa pripadaju svim grupama patogena, virusima, bakterijama i mikoza. Kao najčešći, u slučaju akutnih formi, se ističe *Streptococcus pneumoniae* [7], ali iza njega su odmah i netipizirani *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*.

Kod hroničnih formi otitisa, menja se vrsta uzročnika u korist gram-negativnih i anaerobnih bakterija. Aktivacija infekcije kod hroničnih formi otitisa se dešava obično kao posledica infekcije gornjeg respiratornog trakta, ili ulazom infekcije preko spoljašnjeg slušnog kanala. Uzročnici su mahom multirezistentni organizmi, nastali iz spleta okolnosti koje uključuju stalne tretmane lokalnim antibiotskim kapima i oralnim antibioticima, mikotičku infekciju, ponavljaju kontaminaciju, ponavljaju briseva, smanjeno interesovanje pacijenta, nezadovoljstvo i gubljenje strpljenja lekara i pacijenta kao posledicu toka bolesti. Uobičajeni uzročnici su *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, ali i gljivične infekcije spoljašnjeg slušnog kanala i šupljina

srednjeg uva. [8] Studija iz sedamdesetih godina prošlog veka sa Prve internacionalne konferencije o holesteatomu, pokazuje da se stvari na ovom polju nisu mnogo promenile. Prema autorima, u 67% slučajeva hroničnih otitisa sa holesteatomom izolovana je jedna anaerobna bakterija, u 70% barem jedna aerobna bakterija, a u 50% su bili prisutni i aerobi i anaerobi. U 30% slučajeva bilo je prisutno više od dve vrste bakterijskih uzročnika. [9]

Poznati su inicijalni faktori koji izazivaju ili pomažu nastanak otitisa kod dece kao što su učestale infekcije gornjih disajnih puteva, atopija, anatomske malformacije, određeni faktori rizika kao što su starost, dojenje, boravak u kolektivu, izloženost duvanskom dimu. Kod odraslih, otitisi su posledica infekcija gornjih disajnih puteva, različitih formi rinosinuzitisa i faringitisa, alergijskog rinitisa, infekcija spoljašnjeg slušnog kanala. Postavlja se pitanje zašto kod nekih osoba bolest poprima hroničan tok, a kod ostalih ne, i zašto se hronični otitis kod nekih bolesnika komplikuje, a kod ostalih ne. Iz svakodnevne prakse poznato je da ima bolesnika koji celog života boluju od teških formi otitisa, a nikada ne dobiju komplikacije. Takođe, imamo i slučajeve bolesnika sa blažim oblicima supurativnog otitisa (koji inače veoma retko daju endokranijalne komplikacije) koji se komplikuje meningitisom i smrtnim ishodom. Kada su u pitanju infekcije moguće je da urođeno ili tokom života dolazi do genske mutacije na onim lokusima koji su odgovorni za kontrolu imunog odgovora na infektivni agens. Tkivo reaguje na infekcije početnim imunskim odgovorom (eng. innate immunity) što ima za cilj neposrednu odbranu od infekcije, ali kasnije i aktivaciju stečenog imunskog odgovora (eng. adaptive immunity).

Zanimljiv je komentar Rowersa i saradnika, da je otitis interakcija između početnog i stečenog imuniteta, disfunkcije Eustahijeve tube, virusnog i bakterijskog unosa, genetskih faktora i faktora sredine. [1] Ispitivanja nasleđivanja i razlika prema polu kao bitnih faktora u javljanju otitisa su sprovedena na preko 4000 parova blizanaca sa rekurentnim otitisima u Norveškoj. [10] Ovo istraživanje ističe aditivni genski efekat u predispoziciji otitisima, sa malo većom, ali ne i statistički značajnom, predominacijom muškog pola. Muškarci su imali 72% veću šansu za dobijanje rekurentnog otitisa, a žene 61%. Ista grupa autora je nastavila istraživanje i povezala javljanje otitisa sa tonzilitisom. Došli su do podatka da genetski faktori povećavaju predispoziciju prema infekcijama gornjeg respiratornog trakta za 59%. [11] Ova istraživanja definitivno podržavaju činjenicu da će studije na polju molekularno-genetskog istraživanja omogućiti bolje razumevanje infekcija gornjeg respiratornog trakta.

U daljem tekstu će biti objašnjeno šta je početni imuni odgovor, prikazani načini njegove aktivacije i delovanja, kao i studije koje pokazuju njegovu ulogu u akutnim i hroničnim infekcijama srednjeg uva na životinjama i ljudima. Istraživanja u ovoj oblasti nam mogu konačno doneti odgovore na pitanja koja su prisutna u otorinolaringologiji godinama, pre svega o predviđanju toka otitisa, njegovom lečenju i prevenciji komplikacija kod ugroženih pacijenata. Idealan tretman za otitis i dalje ne postoji. Ulaganje napora u napredovanje na ovom polju, nam donosi nadu da će u budućnosti predstavljen adekvatan tretman za konačno i uspešno izlečenje hroničnog otitisa.

### **Početni imunski odgovor i receptori slični Toll-u**

Imunitet omogućava odbranu višecelijskih organizama protiv stranih mikrobnih patogena, i sastoji se od dve komponente, početnog i stečenog imunog odgovora. Početni imunski odgovor omogućava odmah dostupan odbrambeni mehanizam protiv širokog spektra patogena bez prethodnog izlaganja istom. Osnovne uloge početnog imunskog odgovora su:

1. Prepoznavanje struktura u velikim grupama mikroorganizama i razlikovanja od svojih
2. Aktivacija mehanizama koji uništavaju većinu mikroorganizama
3. Aktivacija i orijentacija adaptivnog imunskog odgovora koji je specifično usmeren na uporne mikroorganizme [12-14]

Formiranje ideje i koncepta početnog imunskog odgovora, kao i interesovanja za njegovo funkcionisanje je začeto otkrićem Toll gena. Mutacije u Toll genima su prvo приметili Christiane Nüsslein-Volhard i Eric Wieschaus sa kolegama, kod voćne mušice *Drosophila-e melanogaster* 1985. godine. Toll geni su identifikovani kao važni u embriogenezi u određivanju dorzalno-aksijalne osovine kod embriona mušice, pa su njihove mutacije dovele do poremećaja u ovoj osovini. Takođe, Toll geni učestvuju u početom imunom odgovoru odraslih *Drosophila*, pa mušice sa mutacijom ovog gena imaju dramatično manju sposobnost aktivacije ekspresije antifungalnog peptida i mogućnost preživljavanja mikotične infekcije. [15,16] Do danas, dokazano je da samo Toll 5 učestvuje u antimikotičnom imunitetu *Drosophila-e*. Ekspresijom ovog gena nastaje transmembranski protein, čiji intracelularni domen aktivira promotor za drozomicin, antimikotički peptid. [17] Ime ove famije gena poteklo na osnovu izjave Christiane Nüsslein-

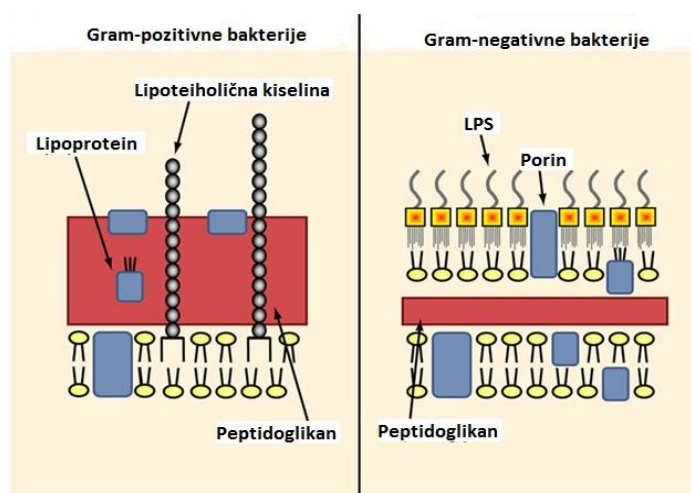
Volhard 1985. „Das ist ja toll!“, koja se sa nemačkog prevodi kao „To je neverovatno/sjajno”, i odnosila se na nerazvijeni ventralni deo larve voćne mušice sa mutacijom Toll gena.

Prvi koji su otkrili Toll-u slične receptore kod ljudi 1994. godine su Nomura i saradnici [18], a gene za ove transmembranske protein-receptore su mapirali na 14. hromozomu 1996. godine Taguchi i saradnici [19]. Ruslan Medzhitov i saradnici su 1997. objavili proces kloniranja humanih Toll-sličnih (homolognih) gena. Pokazali su da, kada je Toll-u sličan receptor (TLR, eng. Toll-like receptor), sada poznat kao TLR 4, veštački aktiviran antigenima, on indukuje aktivaciju NF- $\kappa$ B (eng. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) proteina i ekspresiju gena kontrolisanih od strane NF- $\kappa$ B. TLR je imao i ulogu u aktiviranju naivnih T limfocita (limfocita koji nikad nisu bili izloženi antigenu na koji mogu da odgovore). Ovim otkrićem su povezali početni imunski odgovor sa inicijacijom stečenog imunskog odgovora. [20] Funkcija TLR 4 kao receptora za lipopolisaharide (LPS, eng. lipopolisaharides) su otkrili Bruce Beutler i saradnici 1998. godine, gde je nađeno da miševi sa mutacijom koja je razorila TLR4 receptore ne reaguju na LPS. [21]

U oktobru 2011, Beutler and Hoffmann su bili laureati Nobelove nagrade iz oblasti Medicina i fiziologija za svoj rad na polju aktivacije početnog imunskog odgovora. Do danas je identifikovano 13 članova TLR familije kod sisara. Ekvivalenti nekih TLR koji su nađeni kod ljudi, nisu prisutni kod svih sisara. Kod ljudi funkcionalni su od TLR 1 do 10, dok na primer kod miševa postoji ekspresija i TLR 11, 12 i 13. [22,23]

Početni imunski odgovor nije u potpunosti nespecifičan, kako se u početku mislilo, već je sposoban da napravi diskriminaciju između velikog broja patogena. TLR receptori spadaju u grupu receptora za prepoznavanje molekulskih obrazaca (eng. pattern recognition receptors, PRR). Prepoznaju strukture nazvane molekulski obrasci patogena (eng. pathogen-associated molecular patterns, PAMP) koji uključuju lipopolisaharide bakterijskih zidova, bakterijsku dezoksiribonukleinsku kiselinu (DNK), druge produkte bakterijskih zidova, flagelin, ribonukleinsku kiselinu (RNK) i drugo. [16] PRR imaju neke osnovne zajedničke karakteristike: (a) da su PAMP-ovi koje prepoznaju esencijalni za preživljavanje mikroorganizama i time teški za promeniti; (b) da postoji njihova stalna ekspresija i detekcija patogena bez obzira na starosnu dob domaćina i (c) da imaju ekspresiju na svim ćelijama određenog tipa i nezavisnu imunološku memoriju. [24] Različiti PRP-ovi reaguju sa specifičnim PAMP-ovima, aktiviraju specifične

signalne puteve i dovode do jasnih patogenih odgovora (Slika 1). Takođe, imune ćelije koriste multiple TLR u cilju detekcije više liganada mikroba istovremeno. Specifični TLR mogu detektovati individualne karakteristike različitih klasa mikroba, ili različite strukture na različitim mikrobima, i pokrenuti različite komponente imunskog odgovora. Na primer TLR 5 i TLR 4 detektuju flagelirane gram-negative organizme, a TLR 5 sa TLR 2 i TLR 6 identifikuju flagelirane gram-pozitivne organizme. [25]



Slika 1. Shematski prikaz bakterijskog ćelijskog zida (Adaptirano iz: *Shizuo Akira, Satoshi Uematsu, Osamu Takeuchi. Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell 2006; 124:783–801*)

TLR imaju svoju ekspresiju na različitim imunskim ćelijama, kao što su makrofagi, dendritične ćelije, B limfociti, specifični tipovi T limfocita, kao i neimunskim ćelijama kao što su fibroblasti i epitelne ćelije (Tabela 1).

Tabela 1. Ekspresija TLR na različitim ćelijama i njihovi endogeni i egzogeni ligandi (adaptirano iz: *Shizuo Akira, Satoshi Uematsu, Osamu Takeuchi. Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell 2006; 124:783–801, Ospelt C, Gay S. TLRs and chronic inflammation. Int J Biochem Cell Biol. 2010;42(4):495-505*)

TLR	Ekspresija	Egzogeni ligandi	Endogeni ligandi
TLR 1	Monociti, makrofagi, B limfociti, T limfociti, dendritične ćelije (DĆ), NK ćelije, polimorfonuklearni neutrofili, neimunske ćelije (epitelne, fibroblasti, keratinociti, astrociti)	Tri-acetilisani lipopeptidi, porini	
TLR 2	monociti, DĆ, makrofagi, polimorfonuklearni neutrofili, neimunske ćelije (epitelne, fibroblasti, keratinociti, astrociti)	Lipopeptidi, peptidoglikani, porini, glikolipidi, polisaharidi, virusi, cele bakterije, zimosan, fosfolipomanan, glukoronoksilomanan	Hsp60, Hsp70, Gp96, HMGB1
TLR 3	DĆ, mast ćelije, makrofagi, NK ćelije, (epitelne, fibroblasti, keratinociti, astrociti)	ds RNK	dsRNK
TLR 4	Monociti, makrofagi, DĆ, polimorfonuklearni neutrofili, neimunske ćelije (epitelne, fibroblasti, keratinociti, astrociti)	LPS, manan, glukoronoksilomanan, glikoinozitolfosfolipidi	Hsp60, Hsp70, Gp96, HMGB1, fibrinogen, surfaktant protein A, fibronektin ekstradomen A, heparansulfat, $\beta$ defensin 2
TLR 5	Monociti, makrofagi, T limfociti, DĆ, polimorfonuklearni neutrofili, neimunske ćelije (epitelne, fibroblasti, keratinociti, astrociti)	flagelin	nepoznato
TLR 6	Monociti, makrofagi, B limfociti, T limfociti, DĆ, NK ćelije, polimorfonuklearni neutrofili, neimunske ćelije (epitelne, fibroblasti, keratinociti, astrociti)	Di-acetilisani lipopeptidi	nepoznato
TLR 7	Blimfociti, plazmocitoidne DĆ	ssRNK	nepoznato
TLR 8	Monociti, mijeloidne DĆ	ssRNK	nepoznato
TLR 9	B limfociti, plazmocitoidne DĆ, epitelne ćelije GIT, keratinociti	CpG-DNA	nepoznato
TLR 10	B limfociti, plazmocitoidne DĆ		nepoznato

Ekspresija TLR nije statična, nego dinamična, i brzo se menja u vidu odgovora na patogene, različite citokine i uticaje iz spoljašnje sredine. Neki TLR (TLR 1, 2, 4, 5, i 6) imaju svoju ekspresiju na površini ćelije, dok se drugi (TLR 3, 7, 8, i 9) nalaze skoro uvek u unutarćelijskim prostorima kao što su endozomi, a njihovi ligandi koji su obično nukleinske kiseline, zahtevaju



internalizaciju u endozom pre aktivacije receptora. [24] Čelije koje imaju jaku ekspresiju TLR uključuju i antigen prezentujuće ćelije (APC), kao što su dendritične ćelije i makrofagi, ali je uloga TLR signalnog puta u fagocitozi i dalje kontraverzna. Raniji radovi su isticali ulogu TLR u sazrevanju fagocita, gde skorija istraživanja negiraju ovu vezu. [26, 27] Antigen-prezentujuće ćelije takođe aktiviraju stečeni imunski odgovor migracijom od mesta infekcije do regionalnih limfnih čvorova, prezentujući antigene mikroorganizama dobijene naivnim CD4+ T limfocitima. U isto vreme, aktivirane dendritične ćelije aktiviraju T limfocite, pokrećući diferencijaciju naivnih CD4+ T limfocita u T helper 1 (Th1) ili T helper 2 (Th2) limfocite. Th1 proizvode interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) i medijatori su u eliminisanju virusnih i bakterijskih infekcija, dok Th2 proizvode interleukin-4 i 13 (IL-4, 13), koji su odgovorni za eliminisanje parazitarnih infekcija. Stimulacija većine TLR-a dovodi pre do Th1 nego do Th2 diferencijacije.

Po sastavu, TLR su transmembranski glikoproteini. Njihov ekstracelularni domen se sastoji iz leucin-bogatih ponavljajućih sekvenci (eng. leucin-rich repeats, LRR). Citoplazmatski domen je homolog domenu interleukin receptora 1 (IL-1R), pa se zajedno nazivaju Toll/IL-1R domen ili TIR i čine tzv. receptorsku superfamiliju. Za razliku od TLR, ekstracelularni domen IL-1R se sastoji iz Ig-sličnim sekvenci. [28] TLR funkcionišu kao dimeri, i to najčešće kao homodimeri. Neki, kao što su TLR 2, formiraju heterodimere sa TLR 1 i TLR 6, za koji svaki dimer ima različitu specifičnost za ligande. TLR mogu zavistiti i od drugih ko-receptora, kao što je slučaj kod TLR 4 i prepoznavanja LPS, za koje je neophodan protein MD-2, koji omogućava vezivanje LPS za TLR 4. [29]

Endozomalni TLR, kao što su TLR 3, TLR 7, TLR 8 i TLR 9, prepoznaju nukleinske kiseline virusnog porekla, kao i endogene nukleinske kiseline u slučaju patoloških promena. Aktivacija ovih receptora dovodi do produkcije inflamatornih citokina, kao i tip I interferona (IFN-1) u cilju odbrane od infekcije. Adaptirajući proteini i kinaze koje upravljaju prenosom signala TLR su takođe identifikovane. Kada se aktiviraju, TLR pokreću adaptirajuće molekule iz citoplazme u cilju propagacije signala. Poznata su četiri adaptirajuća molekula MyD88 (eng. myeloid differentiation primary response gene 88), TIRAP/Mal (eng. TIR domain-containing adaptor protein/MyD88-adaptor-like), TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ , TRIF) i Tram. [30-32]

Prenos signala preko TLR je podeljen preko dva puta za prenos signala, MyD88-zavistan i MyD88-nezavistan signalni put.

### ***MyD88-zavistan signalni put***

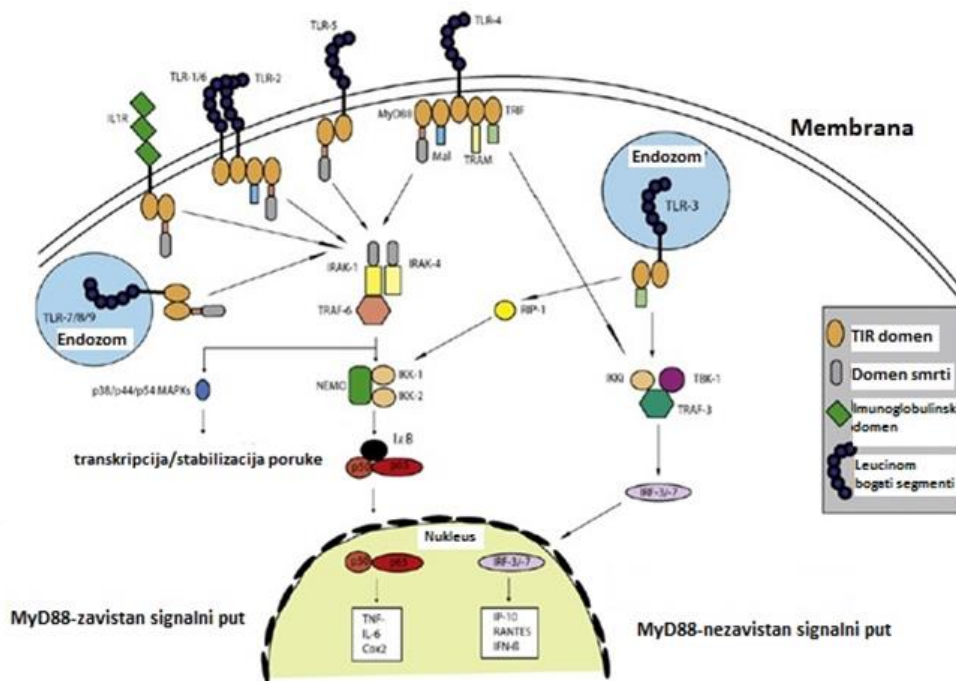
MyD88-zavistan signalni put koristi svaki TLR, osim TLR 3, a pokreće ga dimerizacija TLR-a. Njegov primarni efekat je aktivacija NF  $\kappa$ B i mitogen-aktivirajuće protein kinaze. Vezivanje liganda i konformaciona promena u receptoru se dešava kada se za receptor veže adaptirajući protein MyD88, član TIR familije. MyD88 onda regrutuje interleukin-1 receptor asociirajuću kinazu 1, 2 i 4 (eng. Interleukin-1 receptor-associated kinase, IRAK). IRAK fosforilišu i aktiviraju protein TNF receptor asociirajući factor 6 (eng. Tumor Necrosis Factor receptor associated factor, TRAF6), koji vezuje ubikvitin, mali regulatorni protein (tzv. ubikvitacija) za TAK1 i za sebe, olakšavajući vezivanje za IKK $\beta$ . Po vezivanju, TAK1 (eng. transforming growth factor (TGF)- $\beta$  activated kinase-1, TAK1) fosforiliše kinaze inhibitora NF $\kappa$ B (eng. inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase, IKK $\beta$ ) koji fosforiliše inhibitore  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), degradira i omogućava NF $\kappa$ B da prodre u jedro ćelije i aktivira transkripciju i posledičnu indukciju stvaranja inflamatornih citokina. [33]

### ***MyD88-nezavistan signalni put***

Ovaj put prenosa signala koriste oba TLR 3 i TLR 4. Aktiviraju ga dsRNK i LPS. Kod TLR 3, dsRNK dovodi do aktivacije receptora, vezujući adaptirajući protein TRIF. TRIF aktivira kinaze TBK1 (eng. serine/threonine-protein kinase 1, TBK1) i RIP1 (eng. receptor-interacting protein 1, RIP1), što predstavlja grananje u putu za prenos signala. TRIF/TBK1 signalizirajući kompleks fosforilše IRF3 (eng. Interferon regulatory factor 3, IRF3), dozvoljavajući njegovu translokaciju u jedno i produkciju interferona I. Sa druge strane, aktivacija RIP1 prouzrokuje ubikvitacija TAK1, i transkripciju NF $\kappa$ B na isti način kao i u MyD88 zavisnom putu za prenos signala. [33]

Još jedan signalni put je otkriven posmatranjem indukcije odgovora određenim LPS koji ne zahtevaju MyD88. Ovaj MyD88 nezavisni put za prenos signala kod TLR 4 je identifikovan na osnovu činjenica da je aktivacija NF- $\kappa$ B odložena, ali i dalje se dešava kod MyD88 deficitnih ćelija i da nema aktivacije kod TLR 4 deficitnih ćelija. [33] Dve grupe autora su identifikovale

TIRAP/MAL molekul koji je u interakciji sa TLR4. [34,35] TIRAP/MAL ima karboksi-terminus u vidu TIR domena kao i MyD88, ali dok je amino-terminus MyD88 u interakciji sa IRAK, amino terminus TIRAP/MAL nema poznatu funkciju. Obe studije su pokazale da pojačana ekspresija TIRAP/MAL aktivira NK- $\kappa$ B, a da negativni mutanti za ovaj protein inhibiraju aktivaciju NK- $\kappa$ B indukovanu TLR4, ali ne i IL-1 receptorom. Primećeno je i da je TIRAP/MAL direktno u interakciji sa IRAK-2, ali ne i sa IRAK-1, kao My-D88 koji je u interakciji sa obe kinaze. Inhibitorne forme IRAK-2 ovde mogu blokirati produkciju NF- $\kappa$ B. Uloga TIRAP/MAL u koordinaciji prenosa signala TLR 4 ostaje i dalje neistražena u potpunosti.



Slika 2. Putevi signalizacije Toll-u sličnih receptora (*adaptirano iz: Drexler SK, Foxwell BM. The role of toll-like receptors in chronic inflammation. Int J Biochem Cell Biol. 2010; 42(4):506-18*)

Putevi signalizacije TLR moraju biti precizno regulisani da bi se sprečila nekontrolisana destrukcija ćelija [36] Regulatorni mehanizmi inhibicije TLR-a postoje na svim nivoima prenosa signala, ograničavaju obim inflamatorne reakcije i gase je kada nestane infekcija. Ekspresija većine negativnih regulatora može se indukovati samom aktivacijom TLR-a i deluje na principu negativne povratne sprege. Svaki negativni regulator ima svoj ciljni protein, a mehanizmi delovanja im se razlikuju. Najčešći mehanizmi su degradacija, deubikvitinacija i kompeticija.

## **Endogeni ligandi**

U poslednjih nekoliko godina sve je aktuelnija teorija o vezivanju endogenih liganada za TLR, koji se još nazivaju i „opasni signali” s obzirom da organizam pokreće imunski odgovor na sopstvene antigene. Smatra se da se endogeni ligandi stvaraju tokom oštećenja tkiva i infekcija, prilikom nekroze ćelija, što rezultira oslobađanjem komponenti ekstraćelijskog matriksa, intracelularnih molekula i stres faktora, i pokretanja imunskog odgovora. Nasuprot tome, prilikom apoptoze ćelija, integritet ćelijske membrane se održava, pa ćelije bivaju lizirane od strane makrofaga pre raspadanja. [37] Ovo je dokazano kod DĆ, koje aktiviraju nekrotične ćelije, ali ne i apoptotične ćelije. [38,39] Formirajući komplekse sa drugim endogenim proteinima, endogeni ligandi mogu postati otporni na nukleaze, i time obezbediti prilaz endozomalnim TLR. Ovo se smatra osnovom za objašnjavanje početka i toka autoimunskih i hroničnih bolesti. [40]

## **Aktiviranje TLR-a od strane gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija**

Prepoznavanje mikrobnih komponenti od strane elemenata početnog imunskog odgovora pokreće rane humoralne i celularne mehanizme stečenog imunskog odgovora (eng. adaptive immune response). Produkti bakterija indukuju sintezu i oslobađanje inflamatornim citokina, kao što su faktor nekroze tumora (eng. tumor necrosis factor, TNF) i interleukin -1 (IL-1), što pojačava odgovor na infekciju. Dolazi i do indukcije sekrecije efektivnih citokina, ako što su IL-12, koji kontroliše diferencijaciju CD4 T limfocita, stimulaciju antigen prezentujućih ćelija i proliferaciju B limfocita. Ovo je praćeno brзом inflamatornom reakcijom, aktivacijom monocitima, neutrofilima i endotelnim ćelijama i njihovim produktima kao medijatorima zapaljenja. Tako početni odgovor organizma na mikrobnu invaziju upravlja stečenim imunskim odgovorom. [41]

Identifikacija TLR4 kao receptora za gram-negativne bakterijske lipopolisaharide i TLR 2 kao receptora za gram-pozitivne peptidoglikane i lipopeptide poslužilo je kao inicijalni model u procesu otkrivanja reakcije organizma na širok spektar mikrobnih egzogenih liganada.

### ***Toll-u sličan receptor 2***

Početni imunski odgovor je takođe stimulisan i komponentama ćelijskog zida gram-pozitivnih bakterija. Lipoteiholična kiselina (eng. lipoteichoic acid, LTA) funkcioniše na sličan način kao i LPS u pokretanju imunog odgovora. Pored toga, lipoprotein i peptidoglikani (PG), koji su prezentovani kod gram negativnih i gram pozitivnih bakterija su jaki imunostimulansi, a TLR 2 igra glavnu ulogu u detektovanju ovih egzogenih liganada. Indukciju signala od strane TLR 2 omogućava heterodimerizacija sa ili TLR 6 ili TLR 1 [42]. Dalji prenos signala omogućava MyD88-zavistan signalni put.

Uloga TLR 2 u odbrani organizma od infekcije gram-pozitivnim bakterijama je dokazana na TLR 2 deficijentnim miševima, koji su bili podložni infekcijama *Staphylococcus aureus*-om ili *Streptococcus pneumoniae*. [43,44] Pokazano je da je polimorfizam Arg753Gln u humanom genu za TLR2 povezan sa smanjenim odgovorom na različite bakterijske lipoproteine i septičkim šokom kod infekcije gram-pozitivnim bakterijama, pogotovu sa stafilokoknim septičkim šokom. Ovaj polimorfizam je identifikovan kod velikog broja ispitanika bele rase, čak 6 do 9% su bili heterozigoti. [41]

Lipooligosaharidi (LOS) sa molekularnom strukturom blisko povezanom sa lipopolisaharidima aktiviraju celularni signal preko oba TLR 4 i TLR 2 [45,46]. Netipizirani *H. influenza* poseduje molekule koji mogu biti endogeni liganti za TLR 2, kao što je protein spoljašnje membrane P6 koji pripada grupi peptidoglikana [47].

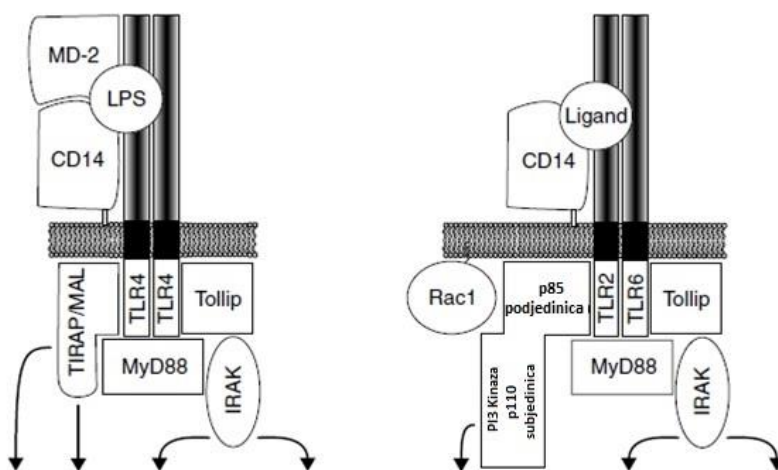
### ***Toll-u sličan receptor 4***

TLR 4 je najviše ispitan i najbolje opisan receptor iz cele familije TLR-a. Otkriven je kloniranjem gena *Lps* kod miševa sa slabim imunskim odgovorom na LPS, zbog mutacije u signalizirajućem domenu TLR 4 [21]. Specifična delecija gena *Lps* potvrdila je ulogu TLR 4 u pokretanju inflamacije posle vezivanja LPS. [48]

Različite bakterije proizvode strukturno različite LPS molekule, koji variraju u svojim obrascima fosforilizacije, broju acil-lanaca i sastavu masnih kiselina, ali je princip aktiviranja TLR-a i pokretanja imunog odgovora isti. LPS oslobođeni od strane gram-negativnih bakterija je u

serumu vezan za LPS-vezujući protein (eng. LPS-Binding Protein, LBP), koji omogućava njegovu reakciju sa CD14 proteinom. Naime, CD14 (eng. Cluster of differentiation 14, CD14) je prvi opisan PRR u detekciji LPS bakterijskog zida gram-negativnih bakterija [49]. CD14 protein formira fizičku vezu sa TLR 4 i ekstracelularnim akcesornim proteinom MD-2, izazivajući dimerizaciju citoplazmatskog domena TLR 4. Kompleks koji se sastoji od TLR 4, MD2 and LPS pokreće TIR domen sa adaptirajućim proteinima TIRAP i MyD88, time aktivirajući NFκB (rana faza) and MAPK (eng. mitogen-activated protein kinases, MAPK). TLR 4-MD2-LPS kompleks tada podleže endocitozi i u endozomu formira signalizirajući kompleks sa TRAM and TRIF adaptirajućim proteinima. Ovaj TRIF-zavistan signalni put dovodi do IRF3 aktivacije i produkcije interferona tipa I, ali i aktivacije NFκB (kasna faza). Aktivacija NFκB u ranoj i kasnoj fazi je potrebna za produkciju proinflamatornih citokina. [50] (Slika 1)

Dve udružene mis-sense mutacije, Asp299Gly and Thr399Ile, su nađene u humanom TLR 4 genu, a dokazano je da je polimorfizam Asp299Gly udružen sa nefunkcionalnim prenošenjem LPS signala, i povećanom podložnosti infekcijama gram-negativnim bakterijama. [41]



Slika 3. TLR 2 i TLR 4 signalni kompleksi (adaptirano iz: *Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. Curr Opin Immunol. 2002; 14(1): 103-10.*)

## **Uloga TLR 2 i TLR 4 u infekcijama srednjeg uva na animalnom modelu**

Dokazano je da ekspresija TLR2 i TLR4 može biti drugačija u zavisnosti od anatomske lokalizacije i bakterijske flore koja se na toj lokaciji nalazi [51]. U gornjem respiratornom traktu već je uspostavljena veza između nazofaringelne flore kod akutnih otitisa i kliničke slike i simptoma bolesti. [52] Zanimljivo je bilo utvrditi ekspresiju TLR 2 i TLR 4 na tim anatomskim lokalizacijama, kako prilikom infekcije, tako i u mirnoj sluznici, u cilju boljeg razumevanja reakcije organizma u procesima akutnih i hroničnih zapaljenja. Istraživanja su počela na životinjama, pre svega zbog dostupnosti uzoraka sluznice, i odnose se pretežno na ekspresiju TLR u akutnim infekcijama.

Song i saradnici su istraživali ekspresiju TLR2 i TLR4 u srednjem uvu, Eustahijevoj tubi, nazofarinksu i oralnoj mukozi pacova [53] i utvrdili značajno veću ekspresiju TLR 2 i TLR 4 u sluznici srednjeg uva, nego na drugim ispitivanim lokacijama. Na taj način dokazana je regionalna specifičnost ekspresije TLR 2 i 4, kao i moguća uloga u patofiziologiji otitisa. Lim i autori su ovu pojavu objasnili činjenicom da šupljina srednjeg uva mora biti sterilna, a u isto vreme mora pružati izrazito visoku barijeru protiv infektivnih patogena, što se postiže visokom ekspresijom TLR. [54]

Započeta su i brojna istraživanja ekspresije TLR 2 i 4 u uslovima akutne infekcije sluznice srednjeg uva, i to gram-negativnom bakterijom *Haemophilus influenzae*, koja se smatra jednim od najčešćih izazivača akutnog otitisa srednjeg uva. Smatra se da pored toga što lipopolisaharidima kao egzogenim ligandima za TLR 4, *H. influenzae* pokreće signalizaciju i TLR 2 porinom, delom polisaharidne kapsule bakterije. [55]

Na eksperimentalnom modelu akutnog otitisa izazvanog sa *H. influenzae* dokazana je uloga TLR 4 u nastanku početnog imunog odgovora u smislu rane akumulacije polimorfonukleara u ognjištu zapaljenja, kao ćelija čije su glavne funkcije fagocitoza i baktericidni efekat. Akutni otitis je bio težeg oblika kod imunodeficijentnih miševa, broj polimorfonukleara je bio 4-10 puta niži u predelu inokulacije *H. influenzae*, a broj bakterija veći. [56] Povećana količina polimorfonukleara je dokazana pomoću imunohistohemijske identifikacije ekspresije ICAM-1 (eng. intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) proteina čija je ekspresija povećana na tim ćelijama u procesu zapaljenja. Polimorfonukleari prepoznaju ICAM-1, čija je ekspresija pojačana u respiratornom traktu stimulacijom lipopolisaharidima i infekcijom gram-negativnim bakterijama. [57] Dokazana

je i povezanost TLR 4 signalnog puta i ekspresije ICAM-1. Vezivanje lipopolisaharida i pokretanje TLR 4 signala, kao i NADPH oksidaza polimorfonukleara, aktivira se NK- $\kappa$ B signal i izaziva povećanje broja TLR2 na endotelnim ćelijama. Ova pojačana ekspresija TLR2 rezultira pojačanjem ekspresije ICAM-1 i izraženijom migracijom polimorfonukleara na mesto infekcije. [58]

Leichtle i saradnici [59] su ispitivali inflamatorni odgovor na netipizirani H. influenzae, koristeći model zapaljenja srednjeg uva kod genetski modifikovanih TLR 2 i TLR 4 negativnih miševa. Kod ovih miševa došlo je do razvijanja obimnije i perzistentnije inflamacije, kao i smanjenog bakterijskog klirensa, u poređenju sa kontrolnom grupom. Nađeni su i smanjeni nivoi TNF- $\alpha$  (eng. tumor necrosis factor alfa, TNF $\alpha$ ), kao i povećana ekspresija antiinflamatornog citokina IL-10. Ovi rezultati su pokazali da je aktivacija TLR 2 i 4 indukovanih signala važna za regulaciju infekcije sluznice srednjeg uva izazvanu netipiziranim H. Influenzae posebno u ranom odgovoru na infekciju što su potvrdili i drugi autori. [60]

Staphylococcus pneumoniae u Srbiji predstavlja jednog od najčešćih izazivača infekcija sluznice srednjeg uva, a kod dece je identifikovana kao bakterija koja je najčešći kolonizator nazofarinksa. [61] Sa uvođenjem polivalentne pneumokone vakcine, u zemljama Evrope i SAD-u prvo mesto je zauzeo netipizirani H. influenzae, a na trećem je M. catarrhalis. Pneumolizin je product S. Pneumoniae koji doprinosi virulenciji ove bakterije, i izaziva brojne inflamatorne reakcije u organizmu, sa posledičnom produkcijom IL-1 i TNF- $\alpha$ . [62-64]

Kod pneumokoknog modela bolesti, TLR 2 negativni miševi su pokazali smanjen bakterijski klirens u kasnijim fazama kolonizacije pneumokokom. Posle inokulacije S. pneumoniae u srednje uvo, 50% TLR 2 negativnih miševa je uginulo u periodu od 3 dana, u poređenju sa kontrolnom grupom. Kod onih koji su preživeli zabeleženo je teško oštećenje sluha. Histološki kod TLR 2 negativnih miševa nađeno je teško oštećenje sluznice, ekspresija proinflamatornih gena smanjena, kao i koncentracije NF- $\kappa$ B i TNF- $\alpha$ . [65] Malley i saradnici su ispitivali process aktiviranja TLR4 pneumolizinom, i došli do zaljučka da su TLR 4 negativni miševi više podložni pneumokoknoj invazivnoj bolesti i kolonizaciji nazofarinksa pneumokokom, nego kontrolna grupa. Takođe proizvodnja IL-6, kao rezultat izlaganju pneumolizinu, zavisi od prisustva adaptirajućeg molekula MyD88. Pneumolizin indukuje proinflamatorni odgovor u makrofagima preko aktivacije TLR 4 peptidoglikanom, ili celim zidom pneumokokne ćelije. [66]



*Moraxella catarrhalis* je gram-negativna, humana bakterija i jedan od izazivača 10-20% otitisa kod dece [67]. Smatra se da lipooligosaharidi (LOS) predstavljaju komponentu koja pokreće početni imuni odgovor preko aktivacije CD14-TLR 4. [68] Schaar i saradnici su dokazali da spoljašnje membranske vezikule (eng. outer membrane vesicles, OMV) služe kao egzogeni ligandi za TLR 2. [69] U ispitivanjima koja su sprovedeli Hassan i saradnici na respiratornoj sluznici TLR 4 negativnih miševa, makrofagi detektuju LOS isključivo preko CD14-TLR4 kompleksa. Ostali TLR, kao što su TLR 2 i TLR9, ali i TLR 4, mogu biti aktivirani živim bakterijama ili bakterijama ubijenih toplotom, i indukovati produkciju proinflamatornih citokina preko My D88-zavisnog i TRIF-zavisnog signalnog puta. Takođe, pokazali su da TLR 4 negativni miševi produkuju značajno manje koncentracije TNF- $\alpha$  i IL-6, kao i da je klirens bakterija vremenski odložen u odnosu na kontrolni grupu. [70]

Studije koje se odnose na mehanizam pokretanja imunskog odgovora u srednjem uvu od strane bakterija *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*, kao najčešćih patogena nađenih kod hroničnih otitisa, nisu sprovedena. Brojna su istraživanja koja ispituju način pokretanja imunskog odgovora posle izlaganja ovim patogenima u plućnom tkivu, što može dalje poslužiti kao model ispitivanja TLR aktivacije i u tkivima srednjeg uva.

Ispitana je aktivacija TLR-a u plućima komponentama ćelijskog zida *P. aeruginosa*-e. LPS *P. aeruginosa*-e predstavljaju egzogene agense za TLR 4 [71], a lipopeptidi ćelijskog zida agense za TLR 2. TLR 2 i TLR 4 su aktivirani i kapsularnim polisaharidom alginatom i egzoenzimom S [72,73]. Flagelin prepoznaje TLR 5 uz mogućnost asistencije u signalizaciji od strane TLR 2 [74]. Dalji prenos signala ide i preko My D88-zavisnog i nezavisnog signalnog puta. Shawn i saradnici su pokazali niske koncentracije TFN  $\alpha$  i IL1 u tkivu TLR 4 negativnih miševa, kao i manju koncentraciju neutrofila u inficiranom tkivu. Kod TLR 2 negativnih miševa koncentracije ovih citokina, kao i broj polimorfonukleara u tkivu se nije značajno razlikovao od kontrolne grupe. To govori u prilog činjenici da TLR2 ima ograničenu ulogu u pokretanju imunog odgovora, bakterijskom klirensu i privlačenju neutrofila u infekcijom zahvaćenom plućnom tkivu. [75]

Skerrett i saradnici su sprovedeli studiju koja se ticala inflamacije koju *P. aeruginosa* i *S. aureus* izazivaju u plućnom tkivu MyD88 negativnih miševa. [76] Odsustvo proinflamatornih citkina i neutrofila kod MyD88 negativnih miševa zaraženih *P. aeruginosa*-om, kao i smanjen odgovor na *S. aureus* ide u prilog da je MyD88 signalni put zadužen za inicijalni imunski odgovor

na ove patogene u donjem respiratornom traktu. Brza aktivacija neutrofila nije moguća u odsustvu MyD88. Kod ovih miševa je zabeležen odloženi inflamatorni odgovor, i autori ga povezuju sa TLR-ima, ali ne i sa MyD88 signalnim putem. LPS mogu pokrenuti signal i u odsustvu MyD88, proizvodnjom alternativnih adaptivnih proteina. MyD88 nezavistan signalni put za *S. aureus* do sada nije opisan. Kasna inflamacija ne mora biti povezana sa TLR, već može biti i posledica oštećenja epitela bakterijama. MyD88 je neophodan za bakterijski klirens *P. aeruginosa*, ali ne i *S. aureus*-a iz plućnog epitela. Ova razlika može biti rezultat uloge različitih fagocita u rezistenciji na ove patogene. Odbrana organizma od *P. aeruginosa* zavisi od rane infiltracije neutrofila, a protiv *S. aureus* od aktivnosti alveolarnih makrofaga. Čak i kod MyD88 negativnih miševa alveolarni makrofagi zadržavaju ovu sposobnost. Dokazano je da neutrofil doprinosi odbrani tkiva posle unosa velikih količina *S. aureus*-a [77], pa nije isključeno da kod MyD88 negativnih miševa prilikom unošenja viših doza stafilokoka postoji smanjena rezistencija na infekciju.

### **Uloga TLR 2 i TLR 4 u infekcijama srednjeg uva kod ljudi**

Pored ekspresije TLR 2 i TLR 4 na različitim strukturama srednjeg uva tokom zapaljenja, značajno je bilo utvrditi koja bi populacija bila podložna razvijanju akutnih i hroničnih formi otitisa, a pogotovu komplikacija ovih oboljenja. Bitan korak u izdvajanju ovih pacijenata je identifikacija polimorfizama gena za TLR 2 i TLR 4, koji imaju važnu ulogu u razvijanju početnog imunskog odgovora na bakterijsku infekciju.

Gen za TLR 4 je lociran na hromozomu 9q32-33. Polimorfizam u ovom genu, Asp299Gly se odražava na promenu strukture TLR4 preko promene aminokiseline u ekstracelularnom domenu TLR4 [78,79] te nemogućava vezivanje LPS. Gen za TLR 2 je lociran na hromozomu 4q32. Najčešći pojedinačni nukleotidni polimorfizam u genu za TLR2 (eng. Single nucleotide polymorphism, SNP) je Arg753Gln, što podrazumeva zamenu aminokiseline arginina glutaminom na mestu 753. Ova mutacija dovodi do poremećaja u signalizaciji TLR 2 po vezivanju nekih liganada i lakše bakterijske infekcije. [80] Pokazano je i postojanje TLR2 polimorfizma Arg677Trp koji je udružen sa smanjenom sposobnošću prepoznavanja komponenti bakterijskog zida. [81]

Grupa finskih autora je sprovedla ispitivanje na 489 dece starosti 3 meseca, da bi utvrdila učestalost polimorfizama u genima za TLR2 i TLR4 i eventualnu povezanost polimorfni oblika

ovih gena sa tipom bakterijske kolonizacije u nazofarinksu. Bakterijske kulture su bile pozitivne kod 59% ispitanika, a bakterije koje su nađene su u 11% slučajeva *Streptococcus pneumoniae*, u 23% *Moraxella catarrhalis*, u 1% *Haemophilus influenzae* i u 25% for *Staphylococcus aureus*. Polimorfna zamena Arg753Gln u genu za TLR2 je utvrđena kod 5% ispitanika, a polimorfna zamena Asp299Gly u genu za TLR4 je utvrđena kod 18% ispitanika. [82]

Emonts sa saradnicima je sproveo vrlo opsežnu studiju na 348 dece koja su bolovala od rekurentnih akutnih otitisa, u cilju utvrđivanja polimorfizama gena koji učestvuju u pokretanju imunog odgovora TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 i TLR4. Nosioci alela 399T u genu za TLR4 su imali statistički značajno manje epizoda akutnih otitisa, tj. alel 399C u genu za TLR4 je udružen sa podložnošću otitisima. Polimorfna zamena je nađena kod 12,4% ispitanika. [83]

Lee i saradnici su u svojoj studiji ispitivali učestalost ovih polimorfizama kod dece sa hroničnim sekretornim otitisom, ali genski polimorfizmi TLR2 (Arg 753Gln, Arg677Trp) i TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile) nisu utvrđeni. Sami autori navode da je moguć razlog mali broj pacijenata u ispitivanoj grupi. Nivo ekspresije TLR 2 u sekretu ove dece bio je značajno veći od nivoa ekspresije TLR4. Nije utvrđena značajna korelacija između nivoa ekspresije TLR 2 i 4 sa nivoom IgA, IgG i IgM i prisustva bakterija u sekretu. [84]

Broj studija koji se bavi utvrđivanjem ekspresije TLR-a na sluznici srednjeg uva u različitim formama hroničnog zapaljenja je ograničen i sproveden na malom broju pacijenata. Utvrđivanje polimorfizama gena TLR 2 i TLR 4 u različitim formama hroničnog otitisa nije rađeno. Szczepanski i saradnici [85] su sprovedi kliničko istraživanje na koje se ticalo uloge TLR u nastanku hroničnog otitisa i holesteatoma na 15 uzoraka. Ispitivali su ekspresiju TLR 2, TLR 3 i TLR 4 u matriksu i perimatriksu holesteatoma, kao i prisustvo T-limfocita. Ekspresija ispitivanih TLR bila je slaba u normalnoj koži, a njihovo izraženo prisustvo utvrđeno u keratinizirajućem epitelu matriksa i perimatriksa holesteatoma.

Slična studija je sprovedena na 12 pacijenata koji boluju od drugih formi hroničnog otitisa, gde su uključeni i pacijenti sa holesteatomom. Nije precizirano o kojim formama hroničnog otitisa je reč, niti je opisano stanje ispitivane sluznice. Nađena je ekspresija TLR 2 i TLR 4 na sluznici srednjeg uva i granulacionom tkivu, i to TLR 4 na mukoznim epitelnim ćelijama, infiltrativnim

inflamatornim ćelijama i makrofagima, a TLR 2 na mukoznim epitelnim ćelijama i infiltrativnim inflamatornim ćelijama. [86]

Švedska grupa autora [87] je pokazala postojanje najmanje šest receptora za prepoznavanje obrazaca (pattern-recognition receptors PPR) na sluznici srednjeg uva, među kojima su TLR 3, 4, 5 i 7. Dokazane su razlike u ekspresiji između uzoraka dobijenih od zdravih ispitanika i ispitanika sa hroničnim formama otitisa. Kako i sami autori navode, grupa od 47 ispitanika je bila nehomogena, ali je postavljena sumnja da hronični otitis media ima infektivno poreklo, bez obzira na oblik hronične infekcije i urođene razlike ispitanika.

# ***CILJEVI ISTRAŽIVANJA***

---

## ***CILJEVI ISTRAŽIVANJA***

Početni imunski odgovor ima ulogu u zaštiti srednjeg uva od infekcije bez prethodne senzibilizacije na patogene. Signalizacija početnog imunskog odgovora je neophodna za pokretanje stečenog imunskog odgovora koji je slabo senzitivovan antigenima koji su prvobitno prezentovani u srednjem uvu. Na ovome je zasnovana pretpostavka da je početni imunitet bitan u oporavku srednjeg uva od infekcije, i da deficijencije u početnom imunitetu izazvane polimorfizmima gena mogu izazvati njihovu izmenjenu ekspresiju na sluznici srednjeg uva. Posledice ovoga se mogu ogledati u povećanim incidenciji otitisa, težoj kliničkoj slici zapaljenja, njegovom povećanom trajanju i javljanju otogenih komplikacija.

U ovom istraživanju postavili smo nekoliko ciljeva:

1. Ispitivanje ekspresije TLR 2 i TLR 4 na sluznici srednjeg uva dece i odraslih sa hroničnim supurativnim otitisom sa i bez hlosteatoma i korelacija sa intenzitetom inflamatornih promena na sluznici i pojavom komplikacija
2. Utvrđivanje zavisnosti ekspresije TLR 2 i 4 od prisustva infekcije bakterijskim uzročnicima
3. Ispitivanje učestalost polimorfizama Arg753Gln u genu za TLR 2 i Thr399Ile u genu za TLR 4 kod kontrolne grupe i dece i odraslih sa hroničnim supurativnim otitisom sa i bez hlosteatoma i njihov uticaj na nastanak, progresiju i oštećenja tkiva tokom hronične inflamacije srednjeg uva

# ***MATERIJAL I METOD ISTRAŽIVANJA***

---

## ***MATERIJAL I METOD ISTRAŽIVANJA***

Studija preseka je sprovedena na Klinici za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju Kliničkog centra Srbije, Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Laboratoriji za Radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke Vinča Univerziteta u Beogradu, u periodu od januara 2010. do decembra 2013. godine.

Ispitanici obuhvaćeni ovom studijom su bili sledeći:

1. Kontrolna grupa za ispitivanje ekspresije proteina je obuhvatila 10 uzoraka makroskopski zdrave sluznice uzetih sa različitih delova srednjeg uva pacijenata sa otosklerozom, kao neinflamatorne bolesti unutrašnjeg uva. Kontrolna grupa za ispitivanje polimorfizama DNK obuhvatila je 100 uzoraka pune krvi uzetih od ispitanika izabranih prilikom redovnog internističkog pregleda u Zavodu za Medicinu rada, Instituta za nuklearne nauke Vinča, Univerziteta u Beogradu. Kontrolnu grupu činile su osobe sa odsustvom hroničnih bolesti, aktivnih infekcija gornjih respiratornih puteva, bez anamnestičkih podataka o postojanju prethodnih infekcija srednjeg uva, pregledane od strane specijaliste interne medicine. Pripadnici kontrolne grupe su imali uredan internistički nalaz, uredan nalaz urađene rentgenografije pluća ne starije od mesec dana; rezultate osnovnih laboratorijskih analiza, krvnu sliku i koagulacioni status u propisanim fiziološkim granicama
2. Eksperimentalna grupa je obuhvatila uzroke tkiva (patološki izmenjene sluznice usled zapaljenja) 85 pacijenata, i to 15 dece i 30 odraslih operativno lečenih zbog hroničnog supurativnog otitisa bez holesteatoma; 10 dece i 20 odraslih operisanih zbog holesteatoma i 10 bolesnika sa komplikacijama otitisa.

Svaki od ispitanika potpisao je informisani pristanak o učestvovanju u studiji, u slučaju dece pristanak su potpisivati roditelji ili staratelji. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Patološke promene mukoze su klasifikovane intraoperativno mikroskopski tokom hiruške intervencije. Pacijenti iz grupe hroničnih otitisa bez holesteatoma su, prema vrsti patološki



izmenjene sluznice, podeljeni u tri podgrupe: pacijente sa edematoznom sluznicom, sa polipozno izmenjenom sluznicom i granuliranom sluznicom. Kod pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatomom uzimana je sluznica koja je bila u kontaktu sa matriksom ili perimatriksom holesteatoma. Ovi pacijenti su podeljeni u dve podgrupe, pacijenti sa matriksom holesteatoma i pacijenti sa perimatriksom holesteatoma. U okviru svake od ovih podgrupa, bili su izdvojeni pacijenti sa komplikacijama.

Od svih kontrola i pacijenata uzeti su uzorci pune krvi iz koje je za potrebe ove studije izolovana DNK i ispitani polimorfizmi u genima za TLR2 (Arg753Gln) i TLR4 (Thr399Ile). Uzorci pune krvi za analizu polimorfizama DNK su uzeti u vakutainere sa EDTA (Etilendiamintetraacetična kiselina, EDTA) ili Na citratom kao antikoagulansom, i to do 4,5ml. Čuvani su na temperaturi od -20°C do transporta uzorka. Transportovani su u ručnom frižideru na ledu do Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke Vinča u Beogradu, gde su čuvani u zamrzivaču na -20°C do dalje obrade uzorka.

Brisevi sekreta srednjeg uva za mikrobiološku analizu su uzimani svakom bolesniku u eksperimentalnoj grupi intraoperativno. Upućivali su se na mikrobiološku analizu u sterilnim epruvetama sa Stuart-ovim medijumom.

### ***Imunohistohemijska analiza tkivnih uzoraka na ekspresiju TLR 2 i 4 antitela***

Tokom operativnih zahvata, od ispitanika su uzimani uzorci sluznice iz srednjeg uva. Ovi uzorci su obrađivani standardnim laboratorijskim metodom: fiksirani u 10% puferovanom formalinu i nakon obrade ukalupljeni u parafinske kalupe. Iz parafinskih kalupa, rotacionim mikrotomom su načinjeni tkivni isečci debljine 5µm za imunohistohemijsku (IHH) analizu. Isečci su izlagani toploti 20 minuta na 620W (u 0,01 M citratnom puferu, PH 6,0) nakon blokiranja endogene peroksidaze (3% rastvor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 15 min.). Za analizu korišćena su poliklonalna antitela za TLR 2 i 4 (razblaženje 1:100, sc-8689 za TLR 2 i sc-8694 za TLR4, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, California, USA). U cilju eliminacije pozadinskog nespecifičnog bojenja korišćeni su blokirajući peptidi specifični za TLR 2 i 4 antitela (N-17 sc8689P za TLR 2 i C-18 sc-8694 za TLR 4, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, California, USA). Avidin/biotin bloking kit

(SP-2001, Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) je aplikovan radi eliminacije nespecifičnog vezivanja LSAB+ reagenasa za endogeni avidin i biotin u isečcima.

Za vizuelizaciju antigen-antitelo reakcije korišćen je 3,3' diaminobenzidin (DAB). Sečci su kontrastirani hematoksilinom (serijski broj s3309, DAKO, Carpenteria, California, USA). Pozitivnom reakcijom smatrana je smeđa obojenost citoplazme ćelija. Leukociti u kapilarnim krvnim sudovima služili su kao pozitivna unutrašnja kontrola. Negativna unutrašnja kontrola obavljena je izostavljanjem primarnog antitela tokom postupka bojenja.

Procena imunohistohemijske reakcije tkivnih uzoraka na TLR 2 i 4 antitela urađena je semikvantitativnom metodom, sa određivanjem procenta pozitivnih ćelija na uveličanju 100x (mikroskop Olympus BX50F4). Procenat imunoreaktivnih ćelija je grupisan na sledeći način:

- Negativna reakcija: do 3% pozitivnih ćelija u uzorku (ocena 0)
- Laka reakcija: od 4 do 33% pozitivnih ćelija u uzorku (ocena 1)
- Umerena reakcija: od 34 do 66% pozitivnih ćelija u uzorku (ocena 2)
- Jaka reakcija: više od 66% pozitivnih ćelija u uzorku (ocena 3)

Ovaj segment ispitivanja je izvršen na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

### ***Detekcija i analiza polimorfizma u genima za TLR2 i TLR4***

Detekcija i analiza polimorfizama DNK gena za TLR 2 i TLR 4 je urađena analizom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (eng. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) ili Taqman metodom sa obeleženim probama i detekcijom amplifikovanih fragmenata u realnom vremenu. Ovaj segment ispitivanja izvršen je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke Vinča Univerziteta u Beogradu, i sastojao se iz nekoliko koraka:

## **1. Izolacija (ekstrakcija) DNK**

Koristila se automatizovana metoda izolacije DNK iz pune krvi na aparatu ABI 6100 PrepStation, korišćenjem standardnih kitova za ovaj aparat. Za određivanje čistoće dobijene DNK apsorbancija je merena na 260 nm i 280 nm.

## **2. Detekcija i analiza polimorfizama DNK u genima za TLR2 i TLR4 PCR-RFLP metodom**

Za Asp299Gly polimorfizam, korišćeni su 5'-ATA CTT AGA CTA CTA CCTCCA TG kao sense prajmer i AGC CTT TTG AGA GAT TTG AGT-3' antisense prajmer. Za Thr399Ile polimorfizam, korišćeni su 5'-GCT GTT CTC AAA GTG ATT TTG GGA kao sense prajmer i CAC TCA TTT GTT TCA AAT TGG AAT G-3' antisense prajmer. PCR (eng. Polymerase Chain Reaction) smeša je napravljena dodavanjem 100 ng genomske DNK u 1×PCR pufer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.2 mM deoksinukleozid trifosfata (dNTPs), 10 pmol svakog prajmera i 1 jedinice DNK polimeraze u finalnoj zapremini od 25 µL koja je bila dopunjena destilovanom dejonizovanom vodom. Posle jednog ciklusa inicijalne denaturacije na 94°C 14 min, uzorci su bili podvrgnuti 35 ciklusa u tri koraka: prvi korak je bila denaturacija tokom 30 sec na 94 °C, drugi korak vezivanje prajmera za ciljnu sekvencu tokom 30 sec (na 64 °C za polimorfizam Arg753Gln, i na 62°C za polimorfizam Thr399Ile), i treći korak sinteza ciljne sekvence koja se vršila tokom 30 sec na 72°C. Na kraju je primenjen jedan ciklus od 72°C 10 min za završnu sintezu. Enzimski digestija i restrikcija je izvršena u 15 µL PCR smeše restrikcionim enzimom Msp I za detekciju polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR 2 i restrikcionim enzimom HinfI za detekciju polimorfizma Thr399Ile 65 °C u genu za TLR 4, u 1x restrikcionom puferu uz 10 jedinica svakog restrikcionog enzima na 37 °C, preko noći. Razdvajanje dobijenih fragmenata izvršeno je na 8% nenedenaturišućem poliakrilamidnom gelu, u 1x Tris-boratom puferu za elektroforezu uz elektroforezu u električnom polju na 90 V na 2h. Gelovi su tretirani srebro-nitratom nakon elektroforeze. Vizuelizacija produkata, detekcija polimorfizama i analiza je izvršena sistemom za snimanje i dokumentaciju gelova GDS 8000 UVP inc.

### ***Mikrobiološka analiza***

Brisevi sekreta srednjeg uva su transportovani u Stuart-ovom medijumu do mikrobiološke laboratorije. U roku od 60 minuta od uzimanja, zasejavani su na podlogu od krvnog agara i podlogu od endo agara, gde su uzgajani na 35°C 24 sata, a potom je vršena identifikacija vrsta uzročnika.

### ***Statistička analiza***

Za statističku analizu bio je korišćen program SPSS v20 (eng. Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc. Chicago, Illinois). Podaci koji su imali kontinualnu vrednost bili su izraženi kao srednje vrednosti i standardne devijacije srednjih vrednosti, sa maksimalnim i minimalnim vrednostima u grupama. Za ispitivanje razlika između ispitivanih grupa korišćen je Pirsonov  $\chi^2$  test, Studentov t test, Man-Vitnijev (Mann-Whitney) test. Za određivanje prognostičkih vrednosti pojedinih analiziranih faktora korišćene su logistička regresija, jednosmerna analiza varijanse (ANOVA) i multivarijantna analiza varijanse (MANOVA). U svim testovima vrednosti verovatnoće, p vrednosti manje od 0,05 smatraće se značajnima, a manje od 0,01 visoko značajnim.

# ***REZULTATI***

---

## REZULTATI

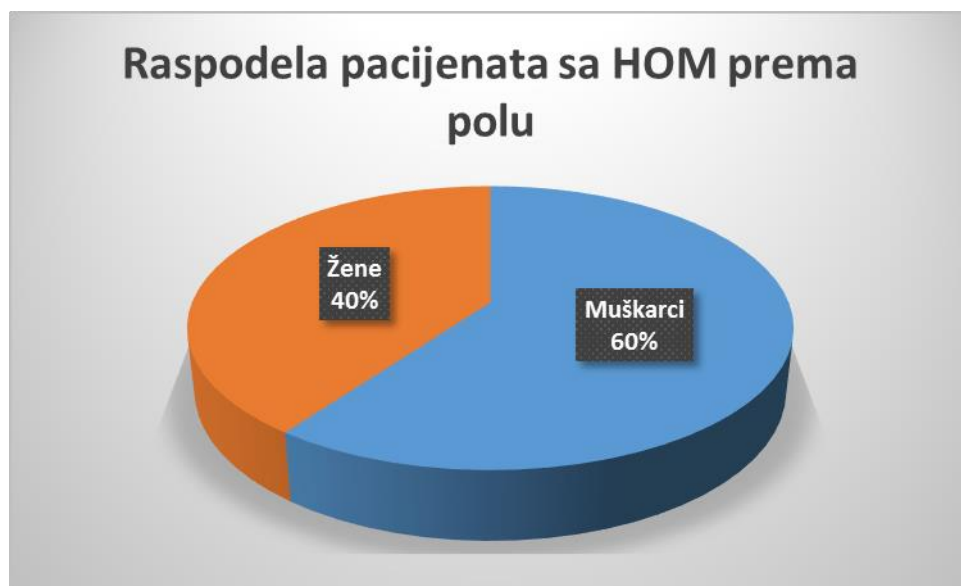
Ova studija je obuhvatila 85 pacijenata, i to 15 dece i 30 odraslih operativno lečenih zbog hroničnog supurativnog otitisa bez holesteatoma; 10 dece i 20 odraslih operisanih zbog holesteatoma i 10 bolesnika sa komplikacijama hroničnog otitisa sa ili bez holesteatoma. Kontrolna grupa za ispitivanje polimorfizama DNK obuhvatila je 100 uzoraka pune krvi zdravih ispitanika, a kontrolna grupa za ispitivanje ekspresije proteina je obuhvatila 10 uzoraka makroskopski zdrave sluznice srednjeg uva pacijenata sa otosklerozom. Patološke promene mukoze su klasifikovane intraopetativno mikroskopski tokom hiruške intervencije.

Prema patologiji, pacijenti iz grupe hroničnih otitisa bez holesteatoma su, prema vrsti patološki izmenjene sluznice, podeljeni u tri podgrupe: pacijente sa edematoznom sluznicom, sa polipozno izmenjenom sluznicom i granuliranom sluznicom. Kod pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatomom uzimana je sluznica koja je bila u kontaktu sa matriksom ili perimatriksom holesteatoma, pa su ovi pacijenti podeljeni u dve podgrupe, pacijenti sa matriksom holesteatoma i sa perimatriksom holesteatoma. U okviru svake od ovih podgrupa, bili su izdvojeni pacijenti sa komplikacijama (Tabela 2)

Tabela 2. Patološke promene u okviru eksperimentalne grupe ispitanika

		HOM bez holesteatoma n/N(%)			HOM sa holesteatomom n/N(%)		Ukupno
		Edematozna sluznica	Polipozna sluznica	Granulirana sluznica	Holesteatom matriks	Holesteatom perimatriks	
<b>Pacijenti bez komplikacija</b>	<b>bez</b>	9/85 (10,59%)	20/85(23,53%)	16/85 (18,82%)	14/85 (16,47%)	16/85(18,82%)	75/85 (88,24%)
<b>Pacijenti sa komplikacijama</b>	<b>sa</b>	2/85 (2,35%)	1/85 (1,17%)	3/85 (3,53%)	1/85(1,17%)	3/85 (3,53%)	10/85 (11,76%)
<b>Ukupno</b>		11/85(12,94%)	21/85(24,7%)	19/85(22,35%)	15/85(11,76%)	19/85(22,35%)	85/85(100%)

U eksperimentalnoj grupi je bilo 51 (60%) ispitanika muškog pola i 34 (40%) ispitanika ženskog pola (Slika 4).



Slika 4. Raspodela pacijenata sa HOM prema polu

Kontrolna grupa je obuhvatila ispitanika 60 (60%) muškog pola i 40 (40%) ispitanika ženskog pola. U grupi hroničnih otitisa srednjeg uva (hronični otitis media, HOM) bez holesteatoma bilo je 26 (50,98%) ispitanika muškog pola i 25 (49,01%) ispitanika ženskog pola. U grupi HOM sa holesteatomom bilo je 19(37,25%) ispitanika muškog pola i 15(62,75%) ženskog pola. (Tabela 3). U kontrolnoj grupi pacijenata za ispitivanje ekspresije gena i proteina bilo je 5 muškaraca i 5 žena. Nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji pola između ispitanika i kontrolne grupe ( $\chi^2=1,446$ ,  $p=0,485$ ).

Tabela br 3. Raspodela ispitanika u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi po polu

	<b>HOM bez holesteatoma</b>	<b>HOM sa holesteatomom</b>	<b>Kontrola</b>
<b>Pol n(%)</b>			
muškarci	26 (50,98%)	19(37,25%)	60 (60%)
žene	25 (49,01%)	15(62,75%)	40 (40%)
<b>Ukupno</b>	51(100%)	34 (100%)	100 (100%)
<i><math>\chi^2=1,446,p=0,485</math></i>			

U grupi pacijenata sa hroničnim otitisom bez holesteatoma, edematoznu sluznicu imalo je 11 (21,57%) pacijenata, polipoznu sluznicu 21 (41,17%), a granuliranu sluznicu 19 (37,25%) pacijenata. (Tabela 4)

Tabela br 4. Raspodela ispitanika sa hroničnim otitisom bez holesteatoma po polu

<b>HOM bez holesteatoma</b>	<b>Edematozna sluznica</b>	<b>Polipozna sluznica</b>	<b>Granulirana sluznica</b>	<b>Ukupno</b>
<b>Pol n(%)</b>				
muškarci	6 (11,76%)	10 (19,61%)	10 (19,61%)	26 (50,98%)
žene	5 (9,8%)	11 (21,57%)	9 (17,65%)	25 (49,01%)
<b>Ukupno</b>	11 (21,57%)	21 (41,17%)	19(37,25%)	51 (100%)



U grupu pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatomom, pacijenata sa matriksom holesteatoma bilo je 15 (44,11%), a sa perimatriksom holesteatoma 19 (55,88%). (Tabela 5)

Tabela br 5. Raspodela ispitanika sa hroničnim otitisom sa holesteatomom po polu

<b>HOM sa holesteatomom</b>	<b>Holesteatom matriks</b>	<b>Holesteatom perimatriks</b>	<b>Ukupno</b>
<b>Pol n(%)</b>			
muškarci	10 (29,41%)	9 (26,47%)	19 (55,88%)
žene	5 (14,7%)	10 (29,41%)	15 (44,11%)
<b>Ukupno</b>	<b>15 (44,11%)</b>	<b>19 (55,88%)</b>	<b>34 (100%)</b>

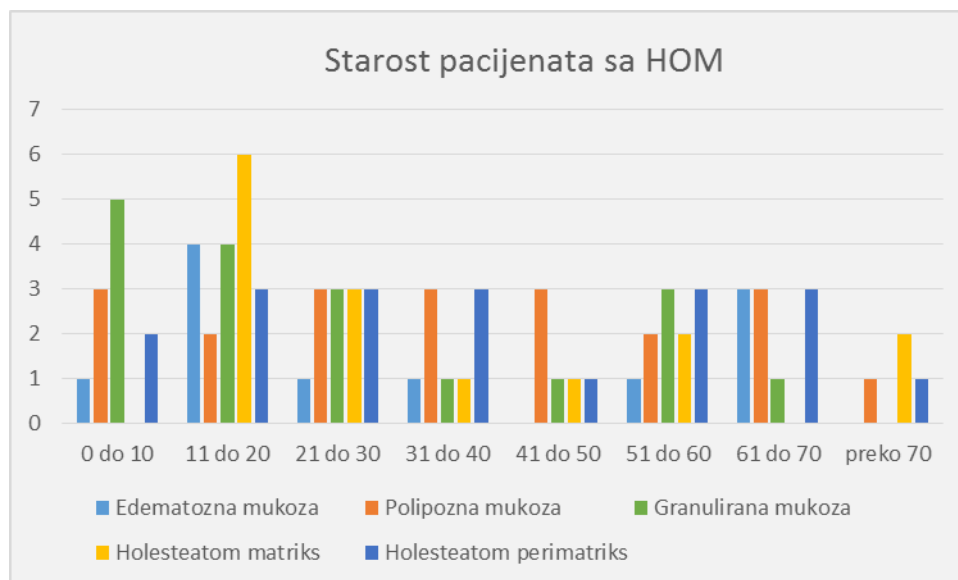
Prosečna starost pacijenata je 34,85 godina. (Tabela 6) Najmlađi pacijent je imao 1 godinu, a najstariji 77 godina. Prosečna starost u grupi pacijenata sa hroničnim supurativnim otitisom bez holesteatoma je 33,12 godina, a u grupi pacijenata hroničnog otitisa sa holesteatomom 36,59 godina. Prosečna starost u kontrolnoj grupi je iznosila 27,67. U kontrolnoj grupi pacijenata za ispitivanje ekspresije gena i proteina prosečna starost ispitanika je bila 40. Starosna distribucija pacijenata u grupama hroničnih otitisa i kontrolnoj grupi nije bila statistički značajna (Pearsonov koeficijent korelacije,  $F= 1,525$ ,  $p=0,22$ ).

Tabela br 6. Raspodela ispitanika u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi po starosti

<b>Starost</b>	<b>HOM bez holesteatoma</b>	<b>HOM sa holesteatomom</b>	<b>Kontrola</b>
<b>sr. vrednost±sd</b>	33,12±21,21	36,59±45,25	27,69±16,97
<b>max</b>	72	77	57
<b>min</b>	1	7	1

Raspodela pacijenata sa HOM prema uzrastu i patološkim promenama sluznice je prikazana na slici 5.

Slika 5. Raspodela pacijenata sa HOM prema uzrastu



U grupi pacijenata sa hroničnim otitisom bez holesteatoma zastupljeni su pacijenti svih godina starosti (Tabela 7), dok su u grupi pacijenata sa holesteatomom zastupljeniji mlađi pacijenti (Tabela 8).

Tabela br 7. Raspodela ispitanika sa hroničnim otitisom bez holesteatoma po starosti

<b>HOM bez holesteatoma</b>	<b>Edematozna sluznica</b>	<b>Polipozna sluznica</b>	<b>Granulirana sluznica</b>	<b>Ukupno</b>
<b>Starost</b>				
0-10	1 (1,96%)	3 (5,88%)	5 (5,88%)	9 (17,64%)
11-20	4 (7,84%)	2 (3,92%)	4 (7,84%)	10 (19,61%)
21-30	1 (1,96%)	3 (5,88%)	3 (5,88%)	7 (13,72%)
31-40	1 (1,96%)	3 (5,88%)	1 (1,96%)	5 (5,88%)
41-50	0 (0%)	3 (5,88%)	1 (1,96%)	4 (7,84%)
51-60	1 (1,96%)	2 (3,92%)	3 (5,88%)	6(11,76%)
61-70	3 (5,88%)	3 (5,88%)	1 (1,96%)	8(15,68%)
preko 70	0 (0%)	1 (1,96%)	0 (0%)	1 (1,96%)
Ukupno	11 (21,57%)	21 (41,17%)	19 (37,25%)	51 (100%)

Tabela br 8. Raspodela ispitanika sa hroničnim otitisom sa holesteatomom po uzrastu

<b>HOM sa holesteatomom</b>	<b>Holesteatom matriks</b>	<b>Holesteatom perimatriks</b>	<b>Ukupno</b>
<b>Starost</b>			
0-10	0 (0%)	2 (5,88%)	2 (5,88%)
11-20	6(17,64%)	3 (8,82%)	9 (26,47%)
21-30	3 (8,82%)	3 (8,82%)	6(17,64%)
31-40	1 (2,94%)	3 (8,82%)	4 (11,76%)
41-50	1 (2,94%)	1 (2,94%)	2 (5,88%)
51-60	2 (5,88%)	3 (8,82%)	5 (14,7%)
61-70	0 (0%)	3 (8,82%)	3 (8,82%)
preko 70	2 (5,88%)	1 (2,94%)	3 (8,82%)
Ukupno	15 (44,11%)	19 (55,88%)	34(100%)

## Komplikacije kod hroničnih otitisa

Komplikacije hroničnih otitisa su se desile kod 10 pacijenata, i to kod 7 pacijenata muškog pola i 3 pacijenta ženskog pola. Prosečna starost pacijenata sa komplikacijama je bila 31,87 godina, najstariji je ima 77 godina, a najmlađi 1 godinu. (Tabela 9). Ne postoji statistički značajna razlika u javljanju komplikacija kod različitih formi hroničnih otitisa ( $\chi^2=0,00$ ,  $p=0,64$ )

Tabela 9. Raspodela pacijenata sa komplikacijama prema polu i starosti

Komplikacije	HOM bez holesteatoma	HOM sa holesteatomom
<b>Pol n/N(%)</b>		
muškarci	4/85 (4,7%)	3/85 (3,53%)
žene	2/85 (2,35%)	1/85 (1,17%)
<b>Starost</b>		
sr. vrednost	21,5	42,25
max	37	77
min	1	11

Što se tiče egzokranijalnih komplikacija otitisa, 4 pacijenta je imalo mastoiditis, jedan paralizu facijalnog nerva i jedan labirintitis. Endokranijalne komplikacije su se javile kod 4 pacijenta, i to meningitis kod 2 pacijenta i cerebralni apsces kod 2 pacijenta. (Tabela 10)

Tabela 10. Pacijenti sa komplikacijama

Pacijeti sa komplikacijama	Pol	Starost	Patološki proces	Komplikacija
1	muški	37	edematozna sluznica	labirintitis
2	ženski	12	edematozna sluznica	meningitis
3	muški	12	granulacije	mastoiditis
4	muški	37	granulacije	cerebralni apsces
5	ženski	1	granulacije	mastoiditis
6	muški	30	polipozno izmenjena sluznica	paraliza n.facialis-a
7	muški	11	holesteatom matriks	mastoiditis
8	muški	55	holesteatom perimatriks	cerebralni apsces
9	muški	26	holesteatom perimatriks	meningitis
10	ženski	77	holesteatom perimatriks	mastoiditis

Posle učinjene multivarijantne analize, ni jedan od ispitivanih faktora prikazanih u tabeli 11 nije bio predviđajući faktor za javljanje komplikacije kod pacijenata sa hroničnim otitisima ( $p>0,05$ ).

Tabela 11. Multivarijantna analiza različitih faktora i pojave komplikacija hroničnih otitisa

Komplikacije	Starost	Bakterijski	Vrsta	TLR 2	TLR 4	TLR 2	TLR 4
<i>Multivarijantna</i>		agens	patološkog	Arg753Gln	Thr399Ile	IHH	IHH
<i>analiza</i>			procesa			ekspresija	ekspresija
<i>B</i>	-0,006	-0,102	0,203	-17,891	-19,152	0,609	0,529
<i>p</i>	0,703	0,689	0,445	0,998	0,999	0,13	0,146
<i>Exp (B)</i>	0,994	0,903	1,225	0,000	0,000	1,839	1,698

### Baterijska infekcija kod hroničnih otitisa

Uzeti su brisevi sluznice srednjeg uva kod svih ispitanika iz eksperimentalne grupe i poslani na mikrobiološku analizu. Izolovani bakterijski uzročnici i njihov raspored je prikazana na slici 6.



Slika 6. Bakterijski agensi izolovani kod pacijenata sa HOM

Najčešće identifikovan bakterijski agens je *Pseudomonas aeruginosa* u 34,1% ispitanika. Za njim slede *Staphylococcus aureus* u 20% ispitanika, *Klebsiella spp.* u 15,3%, *Escherichia coli* u 12,9% i *Proteus mirabilis* u 7,1% ispitanika. Određen broj ispitanika (10,6%) nije imao bakterijsku infekciju. Učinjena analiza korelacije bakterijskog agensa i vrste hroničnog otitisa nije pokazala statistički značajnu vezu ( $\chi^2=4,495$ ,  $p=0,481$ ) (Tabela 12).

Tabela 12. Bakterijski agensi izolovani kod pacijenata sa HOM

<b>Bakterijski agensi</b>	<b>HOM bez holesteatoma</b>	<b>HOM sa holesteatomom</b>	<b>Ukupno</b>
<b>Bez infekcije</b>	8 (9,41%)	1 (1,17%)	9 (10,6%)
<b>Pseudomonas aeruginosa</b>	15 (17,64%)	14(16,47%)	29 (34,12%)
<b>Staphylococcus aureus</b>	9 (10,59%)	8 (9,41%)	17 (20,0%)
<b>Klebsiella spp</b>	8 (9,41%)	5 (5,88%)	13 (15,29%)
<b>Escherichia coli</b>	7 (8,23%)	4 (4,7%)	11 (12,94%)
<b>Proteus mirabilis</b>	4 (4,7%)	2 (2,35%)	6 (7,06%)
<b>Ukupno</b> $\chi^2=4,495, p=0,481$	51 (60%)	34 (40%)	85 (100%)

Posle učinjenog multivarijantne analize, nije bilo statistički značajne povezanosti infekcije različitim bakterijama sa većinom ispitivanih faktora u tabeli 13 ( $p>0,05$ ), ali je bilo povezanosti sa polimorfizmom Arg753Gln u genu za TLR 2 na granici statističke značajnosti ( $p=0,05$ ).

Tabela 13. Povezanost infekcije kod pacijenata sa hroničnim otitisom i ispitivanih faktora

<b>Bakterijski agens</b>	<b>Komplikacije</b>	<b>Vrsta patološkog procesa</b>	<b>TLR 2 Arg753Gln</b>	<b>TLR 4 Thr399Ile</b>	<b>TLR 2 IHH ekspresija</b>	<b>TLR 4 IHH ekspresija</b>
<i>Multivarijantna analiza</i>						
<i>F</i>	0,157	0,191	3,118	1,099	0,786	0,7
<i>p</i>	0,693	0,942	0,05	0,298	0,505	0,555

## Detekcija i analiza polimorfizma u genima za TLR2 i TLR4

Ispitujući polimorfizam Arg753Gln u genu za TLR2, nađena su dva alela G (koji se smatra divljim tipom) i A (koji se smatra varijantnim tipom) odnosno sva tri genotipa; G/G homozigoti, A/G heterozigoti i A/A homozigoti. Kod pacijenata sa hroničnim otitisom bez holesteatoma bilo je prisutno 40 (78,43%) G/G homozigota. Bili su prisutni A/A homozigoti kod 5 (9,8%) pacijenata i A/G heterozigoti kod 6 (11,76%) pacijenata. (Tabela 14) Kod pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatomom, bilo je 22 (64,7%) G/G homozigota, 4 (11,76%) A/G heterozigota i 8 (23,52%) A/A homozigota. U kontrolnoj grupi preovlađivali su G/G homozigoti kod 96 (96%) pacijenata. Bilo je 4 (11,76%) A/G heterozigota, dok A/A homozigota nije bilo. Nije postojala statistički značajna razlika u javljanju polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2 između pacijenata sa hroničnim otitisima bez holesteatoma i hroničnim otitisima sa holesteatomom (Log regression,  $p=0,174$ ).

Tabela 14. Polimorfizam Arg753Gln u genu za TLR2 kod eksperimentalne grupe pacijenata

	Eksperimentalna grupa		Ukupno
	HOM bez holesteatoma	HOM sa holesteatomom	
<b>TLR 2</b>			
<b>Arg753Gln</b>			
<b>A/A</b>	5 (9,8%)	8 (23,52%)	13 (15,29%)
<b>A/G</b>	6 (11,76%)	4(11,76%)	10 (11,76%)
<b>G/G</b>	40 (78,43%)	22 (64,7%)	62 (72,94%)
<b>Ukupno</b>	51(100%)	34 (100%)	100 (100%)
<i>Log regression,</i>			
<i>p=0,174</i>			

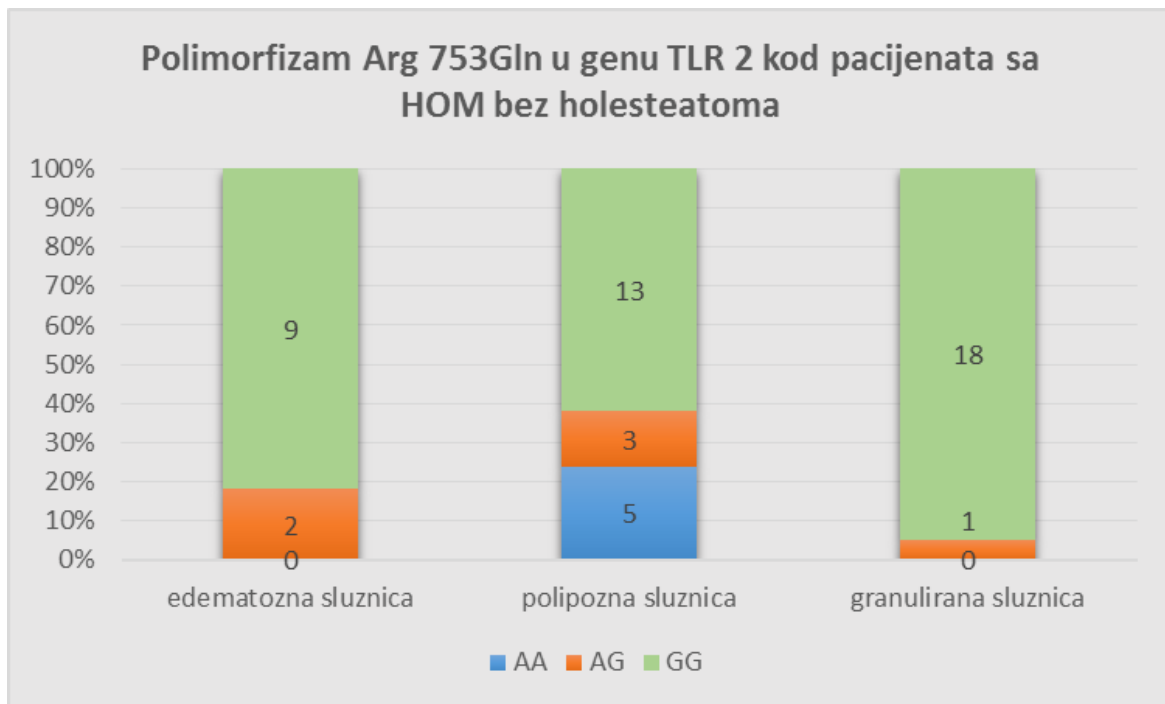


Što se tiče podgrupa sa različitim patološkim promenama sluznice kod hroničnih otitisom bez holesteatoma, sve tri grupe dominirali su G/G homozigoti; 9 (17,65%) pacijenata sa edematoznom sluznicom, 13 (61,9%) pacijenata sa polipozno izmenjenom sluznicom 18 (94,73%) pacijenata sa granuliranom sluznicom. A/G heterozigoti su detektovani kod 2 (18,18%) pacijenta sa edematoznom sluznicom, 3 (14,28%) pacijenta sa polipozno izmenjenom sluznicom i 1 (5,26%) pacijenata sa granuliranom sluznicom. A/A homozigoti su se javili samo kod 5 (23,81%) pacijenata sa polipozno izmenjenom sluznicom. (Tabela 15) Postojala je statistički značajna razlika u distribuciji alela polimorfizma Arg753Gln u genu a TLR 2 kod pacijenata sa različitim patološkim promenama sluznice u okviru grupe hroničnih otitisa bez holesteatoma ( $\chi^2=9,715, p=0,046$ ). Utvrđena je statistički značajno veća učestalost genotipova sa varijantnim aleleom A polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2 kod pacijenata sa polipoznom mukozom u odnosu na granuliranu sluznicu ( $p=0,03$ ).

Tabela 15. Polimorfizam Arg753Gln u genu za TLR2 u grupi pacijenata sa hroničnim otitisom bez holesteatoma u zavisnosti od patoloških promena sluznice

<b>HOM bez holesteatoma</b>	<b>Edematozna sluznica</b>	<b>Polipozna sluznica</b>	<b>Granulirana sluznica</b>	<b>Ukupno</b>
<b>TLR 2 Arg753Gln</b>				
<b>A/A</b>	0 (0%)	5 (23,81%)	0 (0%)	5 (9,8%)
<b>A/G</b>	2 (18,18%)	3 (14,28%)	1 (5,26%)	6 (11,76%)
<b>G/G</b>	9 (81,82%)	13 (61,9%)	18 (94,73%)	40 (78,43%)
<b>Ukupno</b>	11(100%)	21(100%)	19 (100%)	51 (100%)
<b><math>\chi^2=9,715, p=0,046</math></b>				
<b>Logistička regresija</b>				
<i>p</i>	0,906	0,39	0,49	

Na slici 7. je dat grafički prikaz distribucije polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2 u grupi pacijenata sa hroničnim otitisom bez holesteatoma u zavisnosti od patoloških promena sluznice.



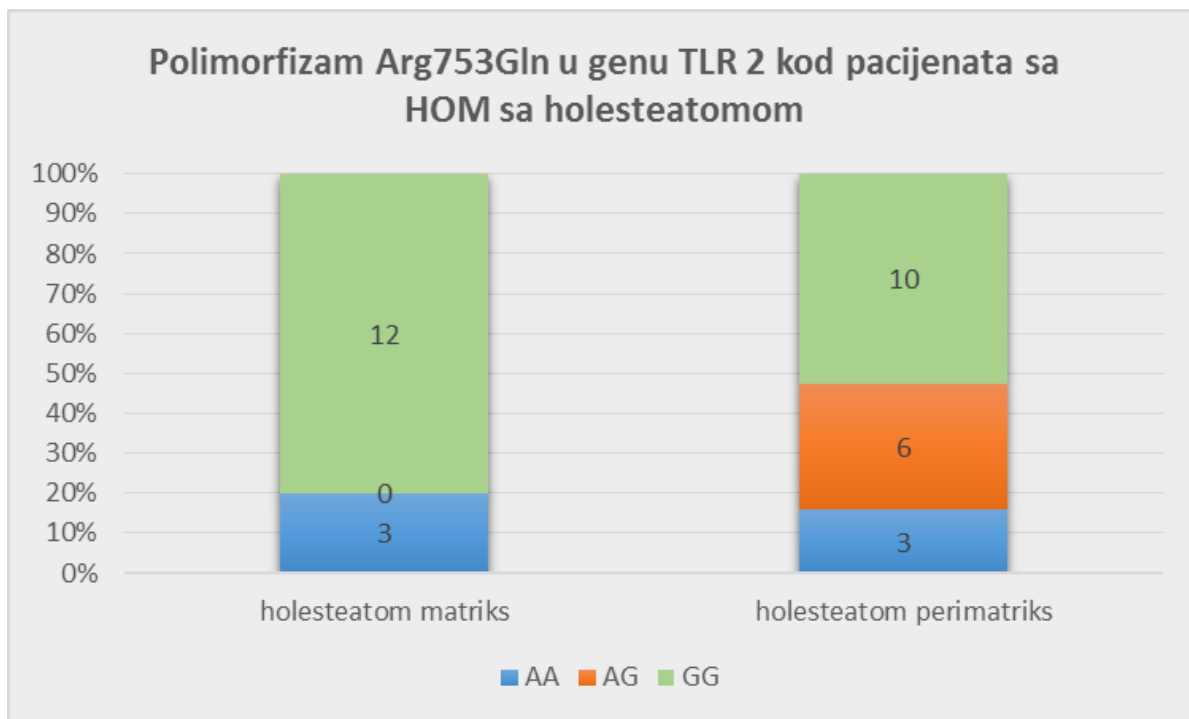
Slika 7. Polimorfizam Arg753Gln u genu za TLR2 u grupi pacijenata sa hroničnim otitisom bez holesteatoma

Kod pacijenata sa hroničnim otitisima sa holesteatomom, u obe grupe dominirali su G/G homozigoti; 12 (80%) pacijenata sa matriksom holesteatoma i 10 (52,63%) pacijenata sa perimatriksom holesteatoma. A/G heterozigota je bilo 6 (31,58%) kod pacijenata sa perimatriksom holesteatoma, dok ih kod pacijenata sa matriksom holesteatoma nije bilo. A/A homozigoti su se javili kod 3 (20%) pacijenata sa matriksom holesteatoma i kod 3 (15,79%) pacijenata sa perimatriksom holesteatoma. Nije bilo statistički značajne razlike u javljanju polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2 kod pacijenata sa različitim patološkim promenama sluznice u okviru grupe hroničnih otitisa sa holesteatomom ( $\chi^2=5,79, p=0,055$ ). Posle učinjene logističke regresije, pokazalo se da polimorfizam Arg753Gln u genu za TLR2 nije bio predviđajući faktori za javljanje HOM sa holesteatomom u ovoj studiji ( $p>0,05$ ) (Tabela 16).

Tabela 16. Polimorfizam Arg753Gln u genu za TLR2 u grupi pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatomom u zavisnosti od patoloških promena sluznice

<b>HOM sa holesteatomom</b>	<b>Holesteatom matriks</b>	<b>Holesteatom perimatriks</b>	<b>Ukupno</b>
<b>TLR 2 Arg753Gln</b>			
A/A	3 (20%)	3 (15,79%)	8 (23,53%)
A/G	0 (0%)	6(31,58%)	4 (11,76%)
G/G	12 (80%)	10 (52,63%)	22 (64,7%)
<b>Ukupno</b>	15 (100%)	19 (100%)	34 (100%)
<i><math>\chi^2=5,79,p=0,055</math></i>			
<i>Logistička regresija</i>			
<i>p</i>	0,955	0,089	

Na slici 8. je dat grafički prikaz distribucije polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2 u grupi pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatoma u zavisnosti od patoloških promena sluznice.



Slika 8. Polimorfizam Arg753Gln u genu za TLR2 u grupi pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatoma

Ispitujući polimorfizam Thr399Ile u genu za TLR4, nađena su dva alela, C koji se smatra divljim tipom), i T (koji se smatra varijantnim tipom), odnosno dva genotipa; C/C homozigoti i C/T heterozigoti. Kod pacijenata sa hroničnim otitisom bez holesteatoma bilo je prisutno 48 (94,12%) G/G homozigota. Bilo je prisutno 3 (5,88%) C/T heterozigota. (Tabela 17) Kod pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatomom, bilo je 31(91,17%) C/C homozigota i 3 (8,82%) C/T heterozigota. U kontrolnoj grupi C/C homozigoti su činili 100% ispitanika. Nije bilo je C/T heterozigota. Nije postojala statistički značajna razlika u javljanju polimorfizma Thr399Ile u genu za TLR4 između pacijenata sa hroničnim otitisima bez holesteatoma i hroničnim otitisima sa holesteatomom (Log regression,  $p=0,345$ ).

Tabela 17. Polimorfizam Thr399Ile u genu za TLR 4 kod eksperimentalne grupe pacijenata

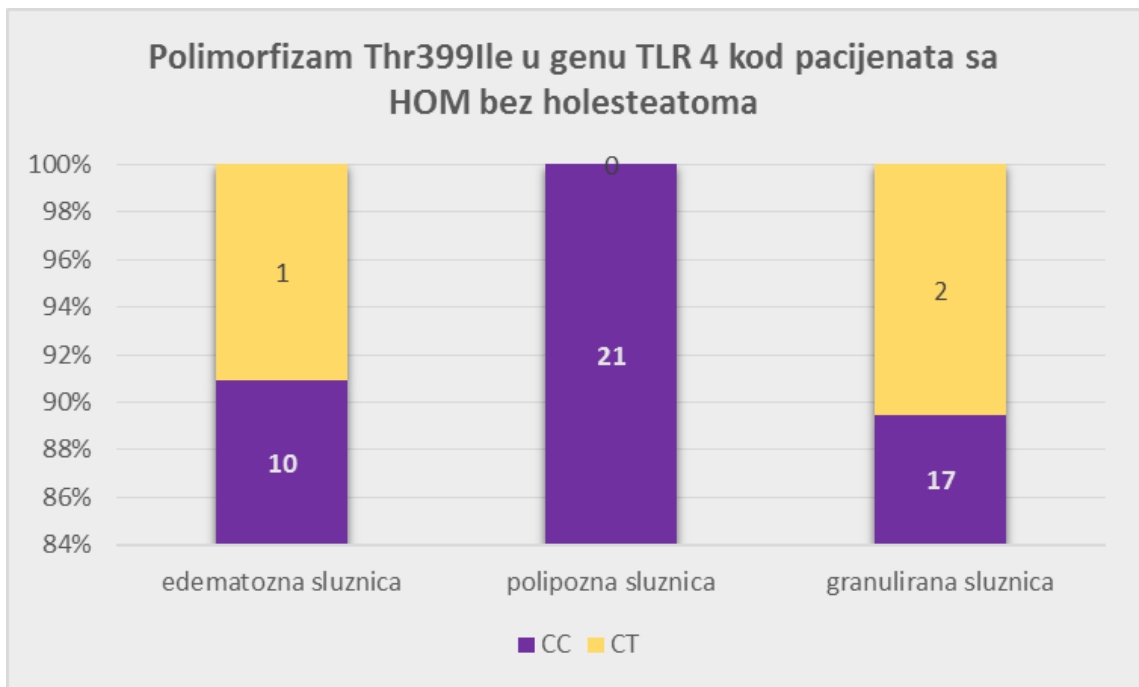
	<b>HOM bez holesteatoma</b>	<b>HOM sa holesteatomom</b>	<b>Ukupno</b>
<b>TLR 4</b>			
<b>Thr399Ile</b>			
<b>C/T</b>	3 (5,88%)	3 (8,82%)	6 (7,05%)
<b>C/C</b>	48 (94,12%)	31(91,17%)	79 (92,94%)
<b>Ukupno</b>	51(100%)	34 (100%)	100 (100%)
<i>Log regression</i>			
<i>p=0,345</i>			

Što se tiče podgrupa sa različitim patološkim promenama sluznice kod hroničnih otitisom bez holesteatoma, kod sve tri grupe dominirali su C/C homozigoti; 10 (90,9%) pacijenata sa edematoznom sluznicom, 21(100%) pacijenata sa polipozno izmenjenom sluznicom i 17 (89,47%) pacijenata sa granuliranom sluznicom. C/T heterozigoti su detektovani kod 1 (9,1%) pacijenta sa edematoznom sluznicom i 2 (10,52%) pacijenta sa granuliranom sluznicom, dok ih nije bilo kod pacijenata sa polipozno izmenjenom sluznicom. Nije bilo statistički značajne razlike u javljanju polimorfizma Thr399Ile u genu za TLR 4 kod pacijenata sa različitim patološkim promenama sluznice u okviru grupe hroničnih otitisa bez holesteatoma ( $\chi^2=2,257, p=0,323$ ). Posle učinjene logističke analize, pokazalo se da polimorfizam Thr399Ile u genu za TLR 4 nije bio predviđajući faktori za javljanje različitih formi HOM bez holesteatoma u ovoj studiji ( $p>0,05$ ) (Tabela 18).

Tabela 18. Polimorfizam Thr399Ile u genu za TLR 4 u grupi pacijenata sa hroničnim otitisom bez holesteatoma u zavisnosti od patoloških promena sluznice

<b>HOM bez holesteatoma</b>	<b>Edematozna sluznica</b>	<b>Polipozna sluznica</b>	<b>Granulirana sluznica</b>	<b>Ukupno</b>
<b>TLR 4 Thr399Ile</b>				
<b>C/T</b>	1 (9,1%)	0 (0%)	2 (10,52%)	3 (5,88%)
<b>C/C</b>	10 (90,9%)	21(100%)	17 (89,47%)	48 (94,12%)
<b>Ukupno</b>	11(100%)	21(100%)	19 (100%)	51 (100%)
<i><math>\chi^2=2,257,p=0,323</math></i>				
<i>Logistička regresija</i>				
<i>p</i>	0,912	0,999	0,681	

Na slici 9 je grafički prikazan polimorfizam Thr399Ile u genu za TLR 4 u grupi pacijenata sa hroničnim otitisom bez holesteatoma u zavisnosti od patoloških promena sluznice



Slika 9. Polimorfizam Thr399Ile u genu za TLR 4 u grupi pacijenata sa hroničnim otitisom bez holesteatoma

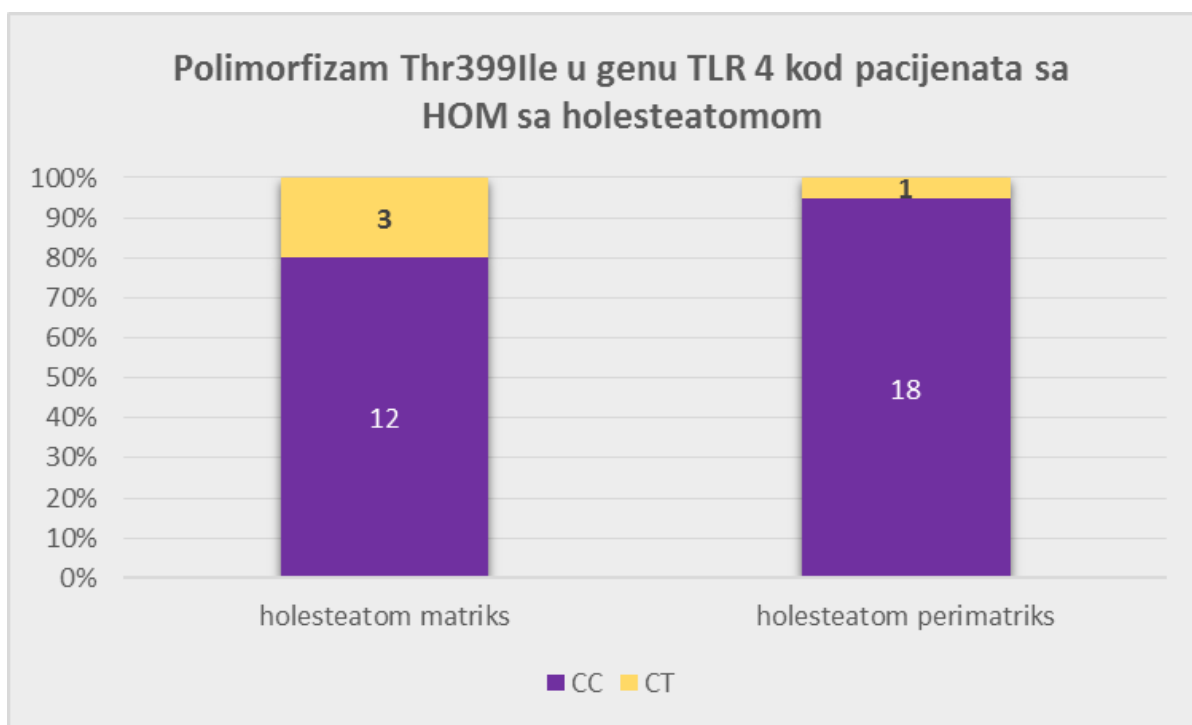
Kod pacijenata sa hroničnim otitisima sa holesteatomom, u obe grupe dominirali su C/C homozigoti; 12 (80%) pacijenata sa matriksom holesteatoma i 18 (94,73%) pacijenata sa perimatriksom holesteatoma. C/T heterozigota je detektovano kod 3 (20%) pacijenata sa perimatriksom holesteatoma i kod 1 (5,26%) pacijenta sa perimatriksom holesteatoma. Nije bilo statistički značajne razlike u javljanju TLR 4 Thr399Ile polimorfizama kod pacijenata sa različitim patološkim promenama sluznice u okviru grupe hroničnih otitisa sa holesteatomom ( $\chi^2=1,754$ ,  $p=0,216$ ). Posle učinjene logističke analize, pokazalo se da polimorfizam Thr399Ile u genu za TLR 4 nije bio predviđajući faktori za javljanje HOM sa holesteatomom u ovoj studiji ( $p>0,05$ ) (Tabela 19).

Tabela 19. Polimorfizam Thr399Ile u genu za TLR 4 u grupi pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatomom u zavisnosti od patoloških promena sluznice

<b>HOM sa holesteatomom</b>	<b>Holesteatom matriks</b>	<b>Holesteatom perimatriks</b>	<b>Ukupno</b>
<b>TLR 4 Thr399Ile</b>			
<b>C/T</b>	3 (20%)	1 (5,26%)	4 (11,76%)
<b>C/C</b>	12 (80%)	18 (94,73%)	30 (88,23%)
<b>Ukupno</b>	15 (100%)	19 (100%)	34 (100%)
<i><math>\chi^2=1,754, p=0,216</math></i>			
<i>Logistička regresija</i>			
<i>p</i>	0,086	0,597	

Na slici 10 je grafički prikazan polimorfizam Thr399Ile u genu za TLR 4 u grupi pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatomom u zavisnosti od patoloških promena sluznice.





Slika 10. Polimorfizam Thr399Ile u genu za TLR 4 u grupi pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatomom

Učinjena je logistička regresija, gde je dokazano da polimorfizam Arg754Gln u genu za TLR 2 i Thr399Ile u genu za TLR 4, koji su nađeni u eksperimentalnoj grupi nisu bili predviđajući faktori za javljanje HOM sa holesteatomom i bez holesteatoma u ovoj studiji. (Tabela 20)

Tabela 20. Logistička regresija za polimorfizam Arg754Gln u genu za TLR 2 i Thr399Ile u genu za TLR 4 u eksperimentalnoj grupi

Logistička regresija	TLR 2 Arg753Gln	TLR 4 Thr399Ile
<i>B</i>	0,492	0,437
<i>p</i>	0,10	0,606

<i>Exp (B)</i>	1,635	1,548
----------------	-------	-------

### Imunohistohemijska analiza tkivnih uzoraka na ekspresiju TLR 2 i 4 antitela

Ekspresija proteina TLR 2 i TLR 4 se utvrđivala na parafinskom preparatu tkiva imunohistohemijskom metodom primenom specifičnih anti TLR 2 i TLR 4 antitela. Ispitujući imunohistohemijsku TLR 2 ekspresiju na uzorcima sluznice, u grupi pacijenata sa HOM bez holesteatoma kod 3 (3,53%) pacijenta nije bilo ekspresije, kod 22 (25,88%) postojala je ekspresija lakog stepena, kod 12 (14,12%) umerenog stepena i kod 14 (16,47%) ekspresija jakog stepena. U grupi pacijenata sa HOM sa holesteatomom kod 15 (17,65%) postojala je ekspresija lakog stepena, kod 2 (2,35%) umerenog stepena i kod 17 (20%) ekspresija jakog stepena. Nije bilo pacijenata bez ekspresije TLR 2 na uzorku u ovoj grupi (Tabela 21). Kontrolna grupa nije pokazali imunohistohemijsku aktivnost na TLR 2 antitela. Postojala je statistički značajna razlika u ekspresiji TLR 2 između eksperimentalne i kontrolne grupe pacijenata (Mann-Whitney test;  $Z=-5,239$ ;  $p=,000$ ), dok između grupa pacijenata sa HOM sa holesteatomom i bez holesteatoma statističke razlike nije bilo (Mann-Whitney test;  $Z=-1,476$ ;  $p=0,14$ ).

Tabela 21. Procena ekspresije TLR 2 na sluznici srednjeg uva kod eksperimentalne i kontrolne grupe pacijenata

<b>TLR 2 IHH ekspresija n(%)</b>	<b>HOM bez holesteatoma</b>	<b>HOM sa holesteatomom</b>	<b>Ukupno</b>
<b>0</b>	3 (3,53%)	0 (0%)	3 (3,53%)
<b>1</b>	22(25,88%)	15 (17,65%)	37 (43,53%)
<b>2</b>	12 (14,12%)	2 (2,35%)	14 (16,47%)
<b>3</b>	14 (16,47%)	17 (20%)	31 (36,47%)
<b>Ukupno</b>	51(60%)	34 (40%)	85 (100%)

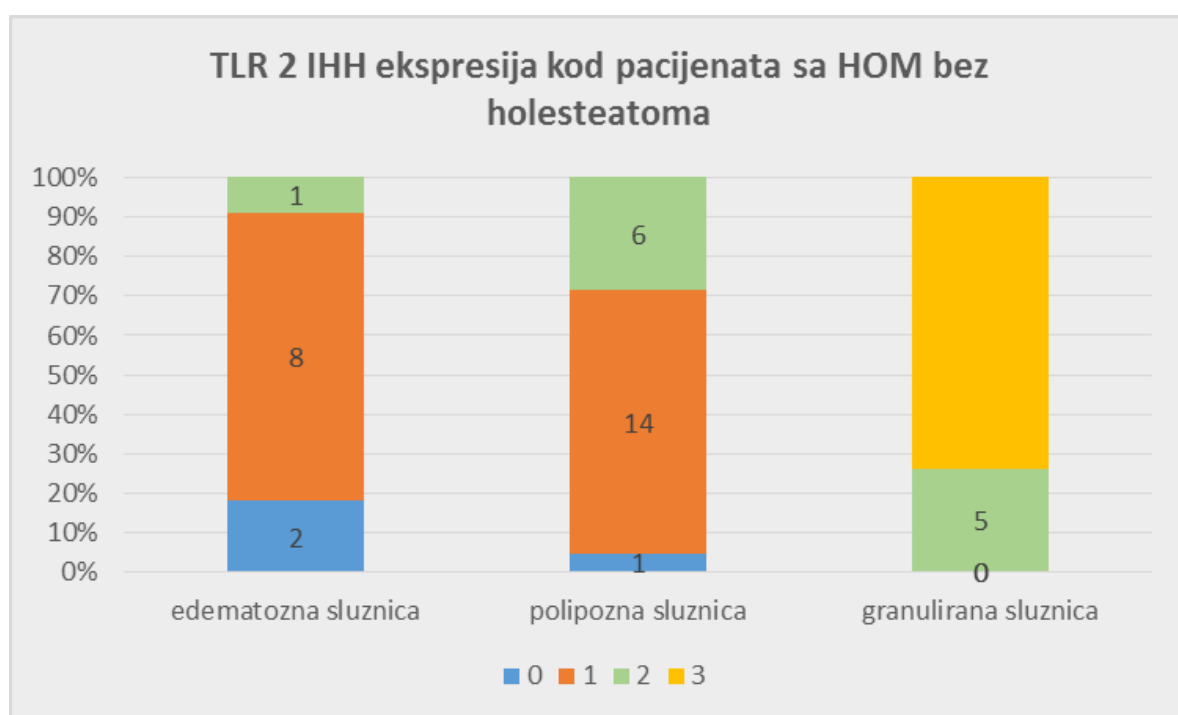
*Mann-Whitney test; p=,000*

Kod pacijenata sa HOM bez holesteatoma sa edematoznom sluznicom nije bilo ekspresije TLR 2 jakog stepena (Tabela 22). Ekspresije TLR2 na ispitivanoj sluznici nije bilo kod 2 (2,35%) pacijenta. Ekspresija lakog stepena nađena kod 8 (15,68%) pacijenata i ekspresija umerenog stepena kod 1 (1,96%) pacijenta. Kod pacijenata sa polipoidno izmenjenom sluznicom, nije bilo ekspresije kod 1 (1,96%) pacijenta, ekspresija lakog stepena je nađena kod 14 (27,45%) pacijenata i ekspresija umerenog stepena kod 6 (11,76%). I na ovako patološki izmenjenoj sluznici nije bilo ekspresije jakog stepena. Kod pacijenata sa granuliranom sluznicom, nisu detektovani uzorci bez ekspresije i sa ekspresijom lakog stepena. Ekspresija umerenog stepena je nađena kod 5 (9,8%) pacijenata i ekspresija jakog stepena kod 14 (27,45%) pacijenata. Statistički značajna razlika između ekspresije TLR 2 na različito patološki izmenjenoj sluznici kod HOM bez holesteatoma je postojala (Kruskal-Wallis test,  $F=36,07$ ;  $p=,000$ ). Posle učinjene logističke analize, pokazalo se da ekspresija TLR2 na sluznici nije bila predviđajući faktor za forme HOM sa edematoznom sluznicom i granuliranom sluznicom ( $p>0,05$ ), ali je bila predviđajući faktor za HOM sa polipozno izmenjenom sluznicom ( $p=0,002$ ).

Tabela 22. Procena ekspresije TLR 2 na sluznici srednjeg uva kod različitih grupa pacijenata sa hroničnim otitisom bez holesteatoma

<b>HOM bez holesteatoma</b>	<b>Edematozna sluznica</b>	<b>Polipozna sluznica</b>	<b>Granulirana sluznica</b>	<b>Ukupno</b>
<b>TLR 2 IHH ekspresija n(%)</b>				
<b>0</b>	2 (3,92%)	1 (1,96%)	0 (0%)	3 (5,88%)
<b>1</b>	8 (15,68%)	14 (27,45%)	0 (0%)	22(39,21%)
<b>2</b>	1 (1,96%)	6 (11,76%)	5 (9,8%)	12 (23,52%)
<b>3</b>	0 (0%)	0 (0%)	14 (27,45%)	14 (27,45%)
<b>Ukupno</b>	11(12,95%)	21 (24,7%)	19 (22,35%)	51 (100%)
<b>Kruskal-Wallis test, <math>p=0,000</math></b>				
<b>Logistička regresija</b>				
<b><i>p</i></b>	0,248	0,002	0,95	

Na Slici 11 je su grafički prikazani rezultati procena ekspresije TLR 2 na sluznici srednjeg uva kod različitih grupa pacijenata sa hroničnim otitisom bez holesteatoma.



Slika 11. TLR 2 IHH ekspresija kod pacijenata sa HOM bez holesteatoma

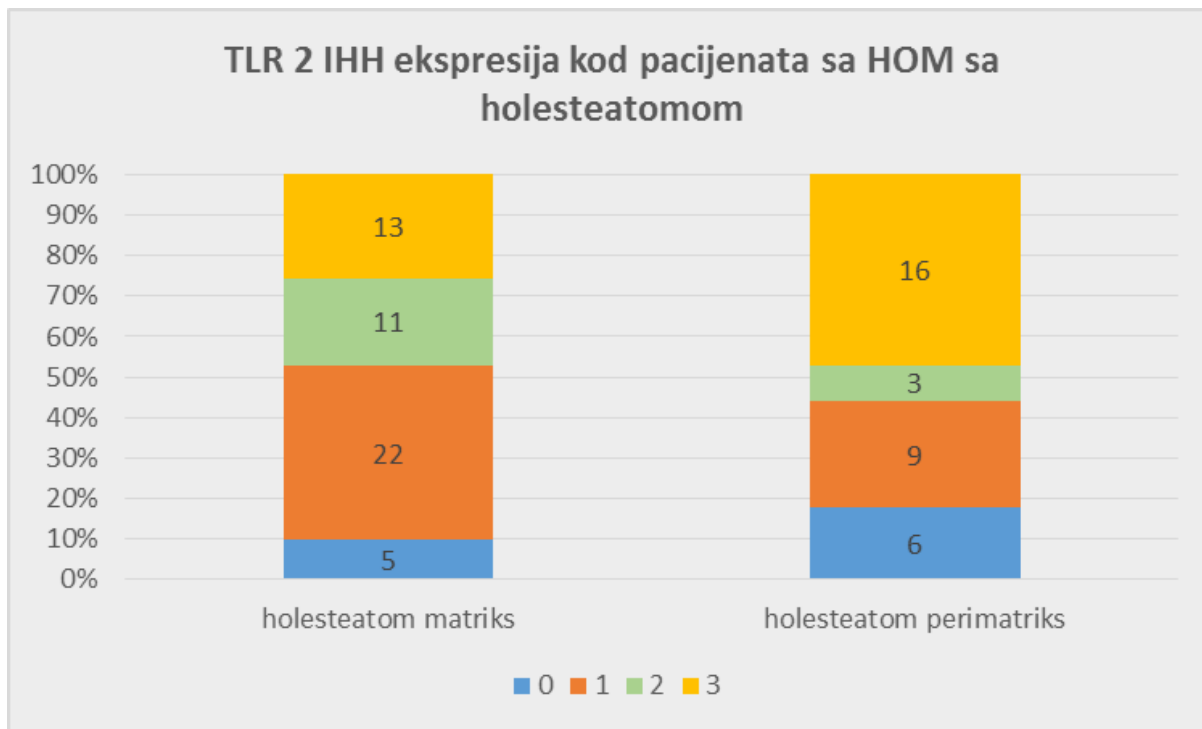
Kod pacijenata sa HOM sa holesteatomom sa matriksom holesteatoma nije bilo uzoraka bez TLR 2 ekspresije, kao i sa ekspresijom umerenog i jakog stepena (Tabela 23). Ekspresija lakog stepena nađena kod svih 15 (44,12%) pacijenata. Kod pacijenata sa perimatriksom holesteatoma, nije bilo ekspresije lakog stepena ni uzoraka bez ekspresije, dok je ekspresija umerenog stepena nađena kod 2 (5,88%) pacijenata i ekspresija jakog stepena kod 17 (50%). Statistički značajna razlika između ekspresije TLR 2 na različito patološki izmenjenoj sluznici kod HOM sa

holesteatomom je postojala (Mann-Whitney test,  $Z=5,562$ ;  $p=,000$ ). Posle učinjene logističke analize, pokazalo se da ekspresija TLR 2 na sluznici jeste bila statistički visoko značajan predviđajući faktor za forme HOM sa holesteatomom ( $p<0,05$ ).

Tabela 23. Procena ekspresije TLR 2 na sluznici srednjeg uva kod različitih grupa pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatomom

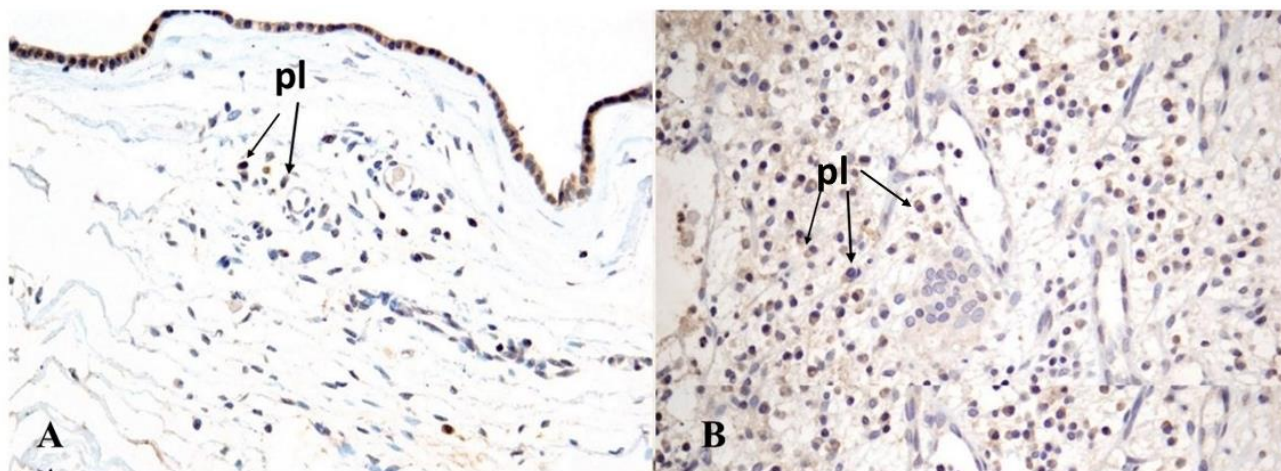
<b>HOM sa holesteatomom</b>	<b>Holesteatom matriks</b>	<b>Holesteatom perimatriks</b>	<b>Ukupno</b>
<b>TLR 2 IHH</b>			
<b>ekspresija n(%)</b>			
<b>0</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>1</b>	15 (44,12%)	0 (0%)	15 (44,12%)
<b>2</b>	0 (0%)	2 (5,88%)	2 (5,88%)
<b>3</b>	0 (0%)	17 (50%)	17 (50%)
<b>Ukupno</b>	15 (44,11%)	19 (55,88%)	34 (100%)
<i>Mann-Whitney test, <math>p=,000</math></i>			
<i>Logistička regresija</i>			
<i>p</i>	0,02	0,000	

Na Slici 12 je su grafički prikazani rezultati procena ekspresije TLR 2 na sluznici srednjeg uva kod različitih grupa pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatomom.



Slika 12. TLR 2 IHH ekspresija kod pacijenata sa HOM sa holesteatomom

Prisustvo limfocita, plazmocita i histiocita, sa fibroblastima i dobrom vaskularizacijom su histološki indikatori hroničnog zapaljenja u sluznici srednjeg uva. Sa druge strane, edematozna i polipoidna sluznica iako biti jako edematozne, mogu biti sa oskudnim hroničnim inflamatornim ćelijama. Na parafinskim preparatima tkiva, edematozna sluznica je pokazala nizak stepen ekspresije TLR 2, sa retkim plazmocitima i makrofagima (Slika 13). Citoplazmatska imunoreaktivnost za TLR 2 je prikazana kao braon obojena citoplazma u plazmocitima. Epitel koji pokriva edematozno tkivo je takođe pokazao veću imunoreaktivnost. Kod tkiva perimatriksa holesteatoma, primećena je jaka imunoreaktivnost za TLR 2, i veliki broj plazmocita i makrofaga sa izraženom citoplazmatskom imunoreaktivnošću.



Slika 13. Pozitivno IHH bojenje za TLR 2 receptore na edematoznoj sluznici (A) i kod perimatriksa holesteatoma (B). Citoplazmatska imunoreaktivnost za TLR 2 je prikazana kao braon obojena citoplazma u plazmocitima (pl). Strukture koje su imuno-nereaktivne, obojene su ljubičasto, zbog kontrasta bojenjem Hematoksilinom. Streptavidin biotin, uveličanje x400.

Ispitujući imunohistohemijsku TLR4 ekspresiju na uzorcima sluznice, u grupi pacijenata sa hroničnim otitisom bez holesteatoma kod 5 (5,9%) pacijenata nije bilo ekspresije, kod 22 (25,88%) postojala je ekspresija lakog stepena, kod 11 (12,94%) umerenog stepena i kod 13 (15,29%) ekspresija jakog stepena. U grupi pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatomom kod 6 (7,06%) pacijenata nije bilo ekspresije, kod 9 (10,59%) postojala je ekspresija lakog stepena, kod 3 (3,53%) umerenog stepena i kod 16 (18,82%) ekspresija jakog stepena (Tabela 24). Kontrolna grupa nije pokazala imunohistohemijsku aktivnost. Postojala je statistički značajna razlika u ekspresiji TLR 2 između eksperimentalne i kontrolne grupe pacijenata (Mann-Whitney test;  $Z = -4,671$ ;  $p = 0,000$ ), dok između grupa pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatomom i bez holesteatoma statističke razlike nije bilo (Mann-Whitney test;  $Z = 0,457$ ;  $p = 0,339$ ).

Tabela 24. Procena ekspresije TLR 4 na sluznici srednjeg uva kod eksperimentalne i kontrolne grupe pacijenata

<b>TLR 4 IHH ekspresija n(%)</b>	<b>HOM bez holesteatoma</b>	<b>HOM sa holesteatomom</b>	<b>Ukupno</b>
<b>0</b>	5 (5,89%)	6 (7,06%)	11 (12,94%)
<b>1</b>	22(25,88%)	9 (10,59%)	31 (36,47%)
<b>2</b>	11 (12,94%)	3 (3,53%)	14 (16,47%)
<b>3</b>	13 (15,29%)	16 (18,82%)	29 (34,12%)
<b>Ukupno</b>	51(60%)	34 (40%)	85 (100%)

*Mann-Whitney test; p=,000*

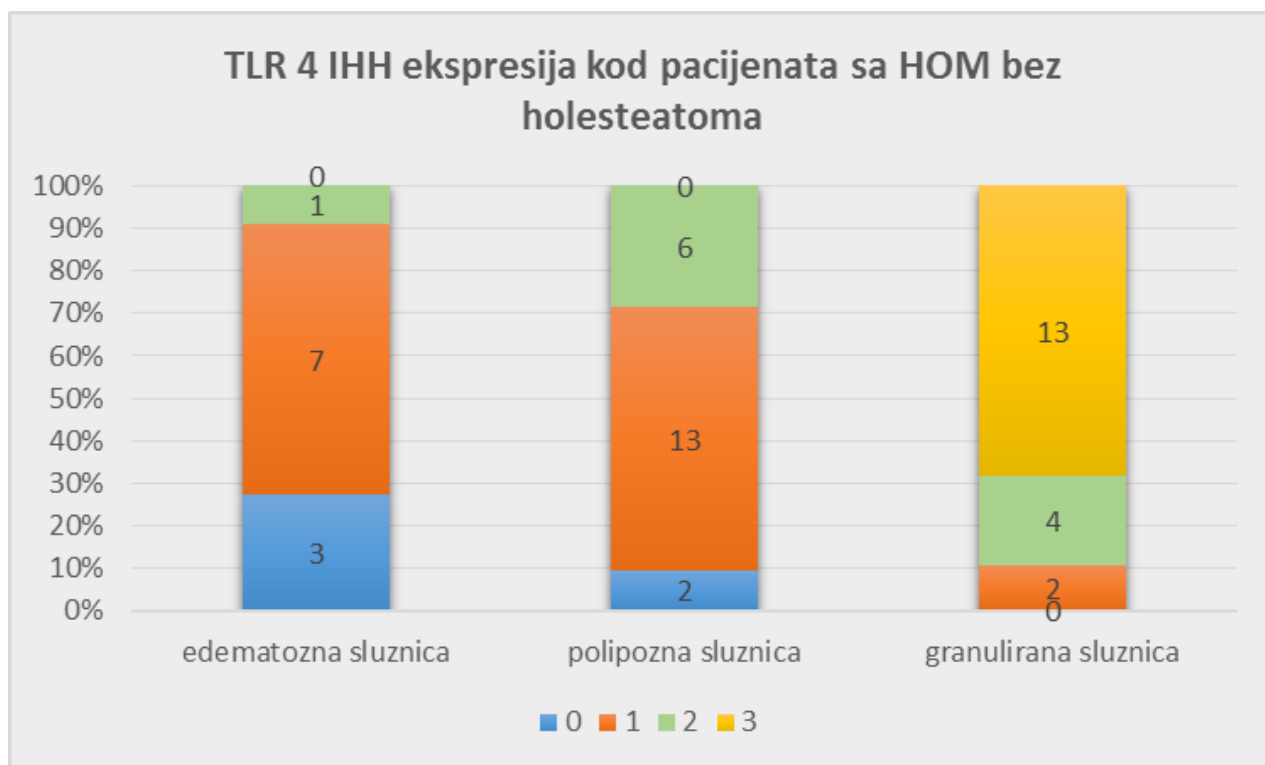
Kod pacijenata sa HOM sa edematoznom sluznicom nije bilo ekspresije trećeg stepena (Tabela 25). Ekspresije TLR 2 na ispitivanoj sluznici nije bilo kod 3 (8,82%) pacijenta. Ekspresija lakog stepena nađena kod 7 (20,59%) pacijenata i ekspresija umerenog stepena kod 1 (2,94%) pacijenta. Kod pacijenata sa polipoidno izmenjenom sluznicom, nije bilo ekspresije kod 2 (5,88%) pacijenta, ekspresija lakog stepena je nađena kod 13 (38,23%) pacijenata i ekspresija umerenog stepena kod 6 (17,65%). I na ovako patološki izmenjenoj sluznici nije bilo ekspresije jakog stepena. Kod pacijenata sa granuliranom sluznicom, nisu detektovani uzorci bez ekspresije. Ekspresija lakog stepena je nađena kod 2 (5,88%) pacijenta, umerenog stepena je nađena kod 4 (11,76%)pacijenata i jakog stepena kod 13 (38,23%) pacijenata. Statistički značajna razlika između ekspresije TLR 4 na različito patološki izmenjenoj sluznici kod HOM bez holesteatoma je postojala (Kruskal-Wallis test,  $F=29,02$ ;  $p=,000$ ). Posle učinjene logističke analize, pokazalo se da ekspresija TLR 4 na sluznici nije bila predviđajući faktor za forme HOM sa edematoznom sluznicom i polipozno izmenjenom sluznicom ( $p>0,05$ ), ali može biti predviđajući faktor za HOM sa granuliranom sluznicom ( $p=0,002$ ).



Tabela 25. Procena ekspresije TLR 4 na sluznici srednjeg uva kod različitih grupa pacijenata sa hroničnim otitisom bez holesteatoma

<b>HOM bez holesteatoma</b>	<b>Edematozna sluznica</b>	<b>Polipozna sluznica</b>	<b>Granulirana sluznica</b>	<b>Ukupno</b>
<b>TLR 4 IHH ekspresija n(%)</b>				
<b>0</b>	3 (8,82%)	2 (5,88%)	0 (0%)	5 (14,7%)
<b>1</b>	7 (20,59%)	13 (38,23%)	2 (5,88%)	22(64,7%)
<b>2</b>	1 (2,94%)	6 (17,65%)	4 (11,76%)	11(32,35%)
<b>3</b>	0 (0%)	0 (0%)	13 (38,23%)	13 (38,23%)
<b>Ukupno</b>	11(21,56%)	21 (41,17%)	19 (37,25%)	51 (100%)
<i>Kruskal-Wallis test, p=,000</i>				
<i>Logistička regresija</i>				
<i>p</i>	0,63	0,568	0,028	

Na Slici 14 je su grafički prikazani rezultati procena ekspresije TLR 4 na sluznici srednjeg uva kod različitih grupa pacijenata sa hroničnim otitisom bez holesteatoma.



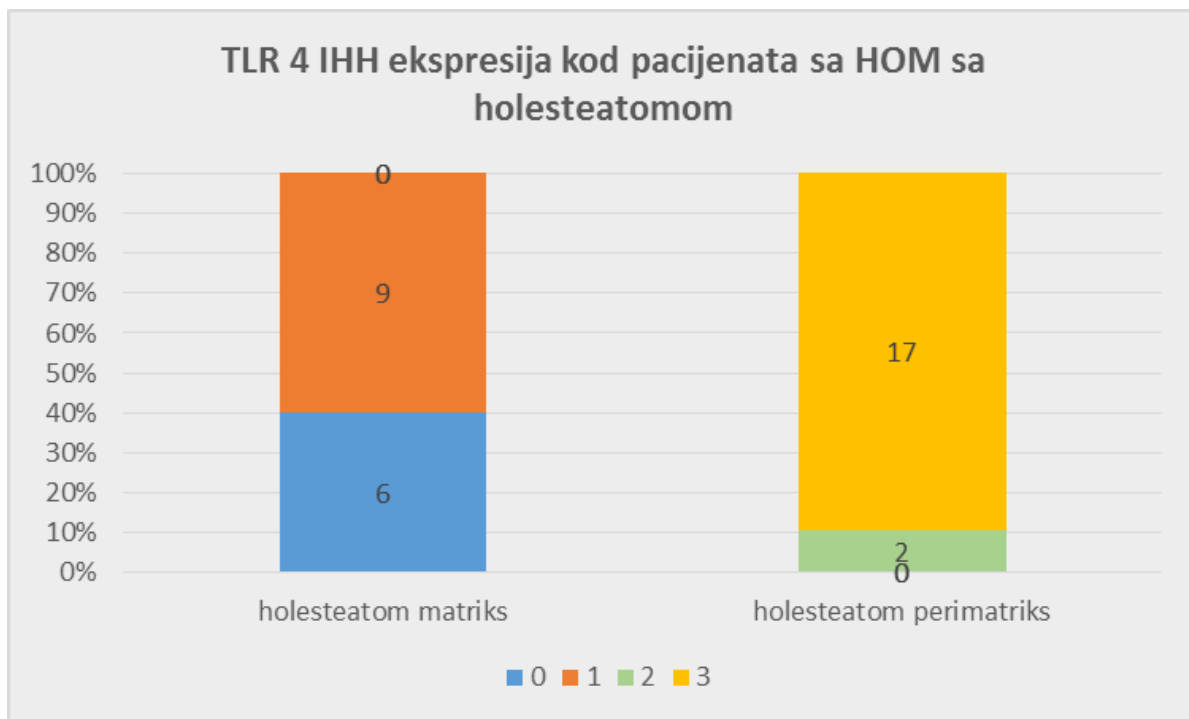
Slika 14. TLR 4 IHH ekspresija kod pacijenata sa HOM bez holesteatoma

Kod pacijenata sa HOM sa holesteatomom sa matriksom holesteatoma nije bilo ekspresije umerenog i jakog stepena (Tabela 26). Ekspresija lakog stepena nađena kod 9 (26,47%) pacijenata, dok ekspresije nije bilo kod 6 (17,64%). Kod pacijenata sa perimatriksom holesteatoma, nije bilo uzoraka bez ekspresije i lakog stepena, dok je ekspresija umerenog stepena nađena kod 2 (5,88%) pacijenta i ekspresija jakog stepena kod 17 (50%). Statistički značajna razlika između ekspresije TLR 4 na različito patološki izmenjenoj sluznici kod HOM sa holesteatomom je postojala (Mann-Whitney test,  $Z=-5,293$ ;  $p=,000$ ) Posle učinjene logističke analize, pokazalo se da ekspresija TLR 4 na sluznici nije bila značajan predviđajući faktor za forme HOM sa holesteatomom ( $p>0,05$ ).

Tabela 26. Procena ekspresije TLR 4 na sluznici srednjeg uva kod različitih grupa pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatomom

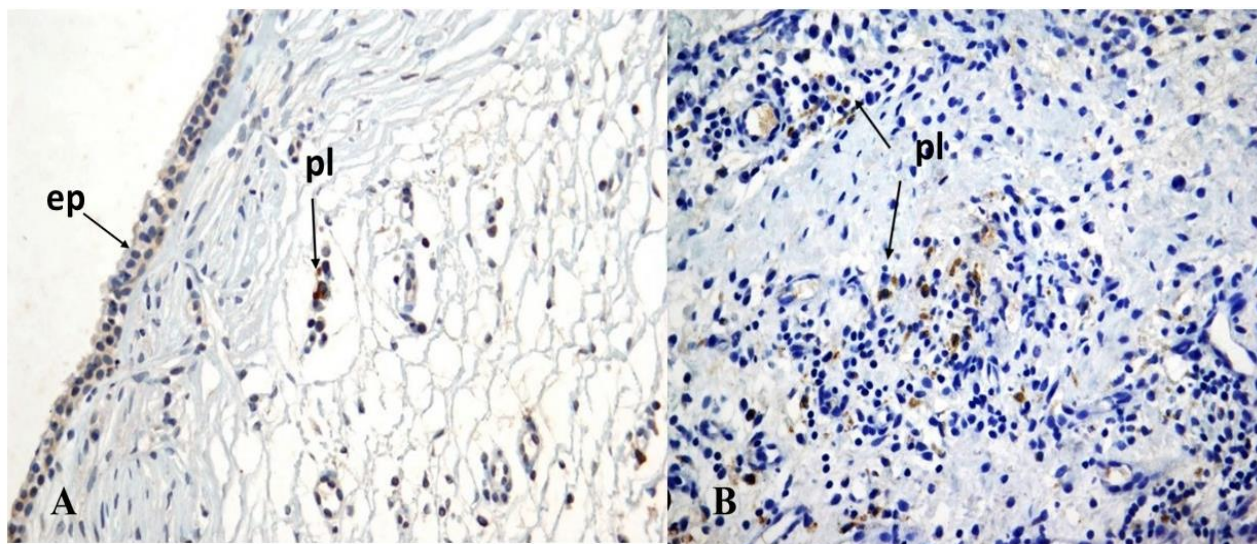
<b>HOM sa holesteatomom</b>	<b>Holesteatom matriks</b>	<b>Holesteatom perimatriks</b>	<b>Ukupno</b>
<b>TLR 4 IHH</b>			
<b>ekspresija n(%)</b>			
<b>0</b>	6 (17,64%)	0 (0%)	6 (17,64%)
<b>1</b>	9 (26,47%)	0 (0%)	9 (26,47%)
<b>2</b>	0 (0%)	2 (5,88%)	2 (5,88%)
<b>3</b>	0 (0%)	17 (50%)	17(50%)
<b>Ukupno</b>	15 (44,12%)	19 (55,88%)	34 (100%)
<i>Mann-Whitney test, p=,000</i>			
<i>Logistička regresija</i>			
<i>p</i>	0,529	0,258	

Na Slici 15 je su grafički prikazani rezultati procena ekspresije TLR 4 na sluznici srednjeg uva kod različitih grupa pacijenata sa hroničnim otitisom sa holesteatomom.



Slika 15. TLR 4 IHH ekspresija kod pacijenata sa HOM sa holesteatomom

To se tiče imunohistohemijske reaktivnosti za TLR 4, na parafinskim preparatima tkiva, edematozna sluznica je pokazala nizak stepen ekspresije TLR4 (Slika 16). Kod tkiva perimatriksa holesteatoma, primećena je jaka citoplazmatska imunoreaktivnost za TLR 4 u hroničnim zapaljenskim ćelijama, plazmocitima i makrofagima. Imuno-nereaktivne strukture su na parafinskim preparatima ljubičasto prebojene, zbog kontrasta hematoksilinskog bojenja.



Slika 16. Pozitivno IHH bojenje za TLR 4 receptore na edematoznoj sluznici (A) i kod perimatriksa holesteatoma (B). Citoplazmatska imunoreaktivnost za TLR 4 je prikazana kao braon obojena citoplazma u plazmocitima (pl). Epitelne ćelije (ep) koje pokrivaju edematozno tkivo su jako imunoreaktivne, ali ne i stroma lamine propria-e. Strukture koje su imuno-nereaktivne, obojene su ljubičasto, zbog kontrasta bojenjem Hematoksilinom. Streptavidin-biotin, uveličanje x 400.

Razlike u imunohistohemijskoj ekspresiji TLR 2 i TLR 4 između pacijenata sa različitim patološkim promenama sluznice ispitivane su Mann-Whitney-evim testom (Tabela 27). Postoji statistički značajna razlika u imunohistohemijskoj ekspresiji TLR2 pacijenata sa edematoznom sluznicom i granuliranom sluznicom ( $Z=-4,701$ ;  $p=0,000$ ), edematoznom sluznicom i perimatriksom holesteatoma ( $Z=-4,984$ ,  $p=0,000$ ), polipoznom sluznicom i granuliranom sluznicom ( $Z=-5,285$ ;  $p=0,000$ ), polipoznom sluznicom i perimatriksom holesteatoma ( $Z=-5,609$ ;  $p=0,000$ ), granuliranom sluznicom i perimatriksom holesteatoma ( $Z=-5,387$ ;  $p=0,000$ ) i pacijenata sa matriksom i perimatriksom holeseatoma ( $Z=-5,562$ ;  $p=0,000$ ). Između ostalih grupa pacijenata, za ovu vrstu ekspresije nije bilo statistički značajnih razlika. Postoji statistički značajna razlika u

imunohistohemijskoj ekspresiji TLR 4 pacijenata sa edematoznom sluznicom i granuliranom sluznicom ( $Z=-4,273$ ;  $p=0,000$ ), edematoznom sluznicom i perimatriksom holesteatoma ( $Z=-4,856$ ,  $p=0,000$ ), polipoznom sluznicom i granuliranom sluznicom ( $Z=-4,645$ ;  $p=0,000$ ), polipoznom sluznicom i perimatriksom holesteatoma ( $Z=-5,467$ ;  $p=0,000$ ), polipoznom sluznicom i matriksom holesteatoma ( $Z=-2,766$ ;  $p=0,006$ ), granuliranom sluznicom i perimatriksom holesteatoma ( $Z=-4,87$ ;  $p=0,000$ ) i pacijenata sa matriksom i perimatriksom holesteatoma ( $Z=-5,293$ ;  $p=0,000$ ). Između ostalih grupa pacijenata, za ovu vrstu ekspresije nije bilo statistički značajnih razlika.

Tabela 27. Razlike u imunohistohemijskoj ekspresiji TLR 2 i TLR 4 između pacijenata sa različitim patološkim promenama sluznice

<b>Mann-Whitney test</b>	<b>TLR 2 IHH ekspresija</b>	<b>TLR 4 IHH ekspresija</b>
<i>Edematozna sluznica-</i> <i>Polipozna sluznica</i>	$Z=-1,582$ $0,052$	$Z=-1,612$ $0,042$
<i>Edematozna sluznica-</i> <i>granulirana sluznica</i>	$Z=-4,701$ $0,000$	$Z=-4,273$ $0,000$
<i>Edematozna sluznica-</i> <i>Holesteatom matriks</i>	$Z=-0,702$ $0,317$	$Z=-0,913$ $0,472$
<i>Edematozna sluznica-</i> <i>Holesteatom perimatriks</i>	$Z=-4,984$ $0,000$	$Z=-4,856$ $0,000$
<i>Polipozna sluznica-</i> <i>Granulirana sluznica</i>	$Z=-5,285$ $0,000$	$Z=-4,645$ $0,000$
<i>Polipozna sluznica-</i> <i>Holesteatom matriks</i>	$Z=-1,175$ $0,052$	$Z=-2,766$ $0,006$
<i>Polipozna sluznica-</i> <i>Holesteatom perimatriks</i>	$Z=-5,609$ $0,000$	$Z=-5,467$ $0,000$
<i>Granulirana sluznica-</i> <i>Holesteatom matriks</i>	$Z=-5,387$ $0,000$	$Z=-4,87$ $0,000$
<i>Granulirana sluznica-</i> <i>Holesteatom perimatriks</i>	$Z=-1,239$ $0,405$	$Z=-1,241$ $0,259$

<i>Holesteatom matriks-</i>	Z=-5,562	Z=-5,293
<i>Holesteatom perimatriks</i>	0,000	0,000

Učinjena je logistička regresija, gde je dokazano da imunohistohemijski dokazana ekspresija TLR 2 i TLR 4 na sluznici srednjeg uva u eksperimentalnoj grupi nisu bili predviđajući faktori za javljanje HOM sa holesteatomom i bez holesteatoma u ovoj studiji ( $p>0,05$ ) (Tabela 28).

Tabela 28. Logistička regresija ekspresija TLR 2 i TLR 4 na sluznici srednjeg uva u eksperimentalnoj grupi

<b>Logistička regresija</b>	<b>TLR 2 IHH ekspresija</b>	<b>TLR 4 IHH ekspresija</b>
<i>B</i>	0,367	0,199
<i>p</i>	0,12	0,342
<i>Exp (B)</i>	1,443	1,220

Učinjena je jednosmerna ANOVA u cilju ispitivanja povezanosti različitih patoloških promena kod ispitanika obe podgrupe u okviru eksperimentalne grupe sa hroničnim otitisima i ispitivanih parametara. Ispostavilo se da postoji visoko statistički značajna povezanost imunohistohemijski dokazane ekspresije TLR 2 i TLR 4 sa vrstom patološkog procesa na sluznici srednjeg uva ( $p<0,05$ ). Takođe, statistički je značajna povezanost zapaženih TLR 2 Arg753Gln polimorfizama sa vrstom patološkog procesa na sluznici srednjeg uva ( $p=0,027$ ), dok ne postoji statistički značajna povezanost patološkog procesa sa zapaženim TLR 4 Thr399Ile polimorfizmima ( $p>0,05$ ) (Tabela 29). MANOVA je pokazala iste rezultate po pitanju povezanosti patoloških promena sluzice srednjeg uva i ispitivanih faktora.

Tabela 29. Povezanost različitih patoloških promena sluznice okviru eksperimentalne grupe i ispitivanih parametara

<b>ANOVA</b>	<b>TLR 2 Arg753Gln</b>	<b>TLR 4 Thr399Ile</b>	<b>TLR 2 IHH ekspresija</b>	<b>TLR 2 IHH ekspresija</b>
<b>F</b>	2,907	1,875	90,35	55,86
<b>p</b>	0,027	0,123	,000	,000



# ***DISKUSIJA***

---

## ***DISKUSIJA***

Hronično supurativno zapaljenje srednjeg uva je bolest prisutna širom sveta sa dugotrajnim opasnim posledicama. Incidenca bolesti se procenjuje na 1,7 do 9,3 na hiljadu ljudi, u zavisnosti od dela sveta. [88] Hronični supurativni otitis je bitan uzrok preventibilnog gubitka sluha sa ozbiljnim dugotrajnim efektima na ranu komunikaciju, razvitak jezika, auditivnu percepciju, psihosocijalni i kognitivni razvoj i edukacioni napredak [89, 90] Ova forma otitisa doprinosi pojačanom korišćenju zdravstvene zaštite, zloupotrebi lekova i samostalnoj primeni lekova, posebno antibiotika i antiinflamatornih lekova. [91] Direktni i indirektni troškovi lečenja hroničnog otitisa i posledičnog gubitka sluha, rešavanje posledica po učenje i smanjene radne performanse, predstavljaju izuzetno visok trošak za individualna domaćinstva, zdravstveni sistem i samo društvo. [92]

Najčešći bakterijski agensi koji se izoluju kod HOM su gram negativne bakterije (npr. *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella species*) ili anaerobi (npr. *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*). Poslednjih nekoliko decenija nije se mnogo toga promenilo u smislu njihove zastupljenosti kod pacijenata bez obzira na starost ili mesto boravka pacijenta. [93, 94-96]

Naša studija je obuhvatila 85 pacijenata sa supurativnim otitisom, starosti od 1 do 77 godina. Bilo je uključeno 45 muškaraca (52,9%) i 40 žena (47,1%), od kojih je 51 (60%) bolovalo od hroničnog supurativnog otitisa bez holestetoma, a 34 (40%) od hroničnog supurativnog otitisa sa holestetomom. Što se tiče izolovanih uzročnika, najčešći je bio *P. Aeruginosa* u 34,1% slučajeva, *S. aureus* u 20%, *Klebsiella spp.* u 15,29%, *E. coli* u 12,94% i *P. Mirabilis* u 7,06% slučajeva. Bakterijski agens nije izolovan u 10,6% slučajeva.

Studija koju su sprovedli Afolabi i saradnici u tercijarnom medicinskom centru u Nigeriji, obuhvatila je 134 pacijenta sa hroničnim supurativnim otitisom starosti od 5 do 64 godine. Raspodela pacijenata muškog i ženskog pola je bila gotovo podjednaka (1,2:1). Najčešće izolovan uzročnik je *P. aeruginosa* u 31,3%, *Klebsiella spp* u 23,9%, *S. aureus* u 16,4%, *P. mirabilis* u 14,9%, *Streptococcus spp* u 11,2% i *E. coli* u 4,5% slučajeva. [97]

Italijanska studija koja je sprovedena na 150 pacijenata starosti između 15 i 65 godina sa hroničnim otitisom sa holestatomom. Od gram-negativnih bakterija, *P. aeruginosa* je izolovan u 31.1%, zatim *S. aureus* u 19.1%, *Proteus mirabilis* u 7.7%, *Escherichia coli* u 1.4% i *Klebsiella pneumoniae* u 1% slučajeva. Anaerobne bakterije su nađene u 38,2% slučajeva, i to *Peptococcus* u 12.4% i *Peptostreptococcus* u 4.8% slučajeva. U izolatima su nađeni i *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium* i *Propionobacterium*. [98]

Madana i saradnici su sproveli ispitivanje na pedijatrijskoj populaciji od 223 dece lečene u periodu od 6 godina, starosti od 1 do 14 godina. Uzročnici koji su nađeni u izolatima su bili *P. aeruginosa* u 32%, *P. mirabilis* u 20% i *S. aureus* u 19% slučajeva. U 9 % slučajeva nije bilo izolovanih uzročnika, što autori pripisiju prethodnom uzimaju antibiotske terapije. U posmatranoj studiji preovlađivali su monomikrobni uzorci, i to u 98,7%. [99]

Studija publikovana pre tri decenije imala je sličan procenat zastupljenosti uzročnika. Brook i saradnici su se bavili izolovanjem uzročnika od pacijenata sa HOM. U njihovoj studiji najčešći uzročnik je bio *P. aeruginosa*, dok su ga po procentu izolovanih uzoraka pratili *S. aureus* i diphteroidi [100]. Aygagary i saradnici su 1981. godine sproveli studiju na 115 pacijenata sa supurativnim otitisom i izolovali anaerobne bakterija u 10% slučajeva, aerobne u 35% i polimikrobnu floru u 50% slučajeva. Najčešće izolovani anaerobi su bili *Bacteroides* i gram-pozitivne koke, dok su najčešći aerobi bili *P. aeruginosa*, *S. Aureus* i *Proteus*. [101]

Rezultati ovih studija podržavaju naše nalaze, uz napomenu da je u našu studiju uključena isključivo populacija pacijenata sa monobakterijskom florom, radi daljeg ispitivanja aktivacije TLR na patološki izmenjenoj sluznici srednjeg uva.

Na globalnom nivou, od komplikacija otitisa umre 21 hiljada ljudi godišnje. [88] Incidencija mortaliteta je opala sa unapređenjem hiruških tehnika, napretka u intenzivnoj nezi, edukacijom lekara i prepoznavanju komplikacija i blagovremenom saradnjom sa infektolozima i neurohirurzima. [102] Trenutne stope mortaliteta pacijenata sa intrakranijalnim komplikacijama variraju u granicama od 0 do 25% [103-107]. U našoj studiji nije bilo smrtnih ishoda zbog komplikacija HOM.

Javljanje komplikacija HOM-a je, prema literaturi, češće kod mlađih osoba, posebno u prvoj, drugoj i trećoj deceniji života, i to češće od muškaraca nego kod žena [108,109], što je u potvrđeno i našom studijom. Endokranijalne komplikacije se javljaju češće od intrakranijalnih. Smatra se da su najčešće endokranijalne komplikacije mastoiditis, labirintitis i Bezoldov apsces,

dok su intrakranijalne tromboza sigmoidnog sinusa, meningitis, cerebralni i cerebelarni apscesi. [102, 103, 109, 110]. U našoj studiji najčešća endokranijalna komplikacija je bila mastoiditis, a najčešća intrakranijalna meningitis.

Pojava intrakranijalnih i ekstrakranijalnih komplikacija je najčešće udružena sa supurativnim hroničnim otitisom sa holesteatomom. Kangsanarak i saradnici [103] su naveli da se kod 80% pacijenata komplikacije otitisa nastaju na terenu HOM sa holesteatomom. Osmi i saradnici [110] navode slične rezultate. Pacijenti sa komplikacijama otitisa su u 78,5% bolovali od hroničnog otitisa sa holesteatomom, a u 21,5% slučajeva od supurativnog hroničnog otitisa sa granulacijama. Sun [109] navodi da su se komplikacije javile kod 76,4 % pacijenata sa HOM sa holesteatomom i kod 23,6% HOM sa granulacijama. U našoj studiji patologija odgovorna za javljanje komplikacija je bila različita, HOM sa holesteatomom u 40%, HOM sa granulacijama u 30%, ali i HOM sa edematoznom sluznicom i HOM sa polipozno izmenjenom sluznicom u 20%.

#### **Polimorfizmi u genima za TLR 2 i TLR 4**

Mnoge studije se su koncentrisale na uticaj polimorfizama TLR na početni imunitet kod pojedinih bolesti. Genetske varijacije TLR gena mogu imati ulogu u podložnosti hroničnim inflamatornim bolestima. [111] Procenat ovih polimorfizama može značajno varirati u različitim rasama.

Dva pojedinačna nukleotidna polimorfizma (SNP) Arg 677Trp i Arg753Gln u genu za TLR 2, i dva SNP Asp299Gly i Thr399Ile u genu za TLR 4, su povezana sa podložnošću infekciji patogenim bakterijama, zbog toga što uzrokuju aminokiselinske zamene u receptorima koje utiču na njihovu funkcionalnu sposobnost da slabije vezuju aktivirajuće ligande. [112] Polimorfizmi Asp299Gly i TLR 4 Thr399Ile u genu za TLR 2 su povezani sa smanjenim odgovorom TLR na LPS i povećanim rizikom od gram-negativnih infekcija. [79] Schroder i saradnici su istakli da su polimorfizmi Arg677Trp i Arg753Gln u genu za TLR 2 povezani sa nižom sposobnošću ćelija da prepoznaju komponente bakterijskog ćelijskog zida. Studija je sprovedena na eksperimentalnim životinjama, ali je zapaženo da je bilo prisutno 9,4% Arg753Gln heterozigota za gen za TLR 2 u eksperimentalnoj grupi čiji je odgovor na stimulaciju LPS bio smanjen. [81]

Grupa autora je ispitivala povezanost pojave rekurentnih infekcija respiratornog trakta kod dece i polimorfizama Arg753Gln i Arg677Trp u genu za TLR 2. Studijom je bilo obuhvaćeno 52 dece u eksperimentalnoj grupi i 91 zdravo dete. [113] Pod rekurentnim febrilnim infekcijama, autori su smatrali pet ili više infekcija gornjeg respiratornog trakta godišnje praćenih povišenom telesnom temperaturom. U ovoj studiji deca koja su bila podložna rekurentnim febrilnim infekcijama i koja nisu imala klasičnu imunodeficijenciju bila su heterozigoti za polimorfizama Arg753Gln u genu za TLR2 u većem procentu nego kontrole (23.1% prema 9.9%). Bilo je 6 pacijenata (11.5%) koji su bili A/A homozigoti, a homozigota nije bilo u kontrolnoj grupi.

Lee i saradnici [84] su ispitivali mutacije u genima za TLR 2 i TLR 4 kod 40 koreanskih pedijatrijskih pacijenata sa sekretornim otitisom kao forme hroničnog otitisa kod dece. Nisu ustanovili ni TLR 4 (Thr399Ile) ni TLR 2 (Arg 753Gln) polimorfizme gena u ispitivanim uzorcima sekreta dobijenog intraoperativno iz srednjeg uva. TLR na tkivima ljudskog organizma mogu biti prisutni u različitim nivoima ekspresije, ali njihova ekspresija u sekretu izolovanom iz srednjeg uva ne mora biti značajna. [114]

Carroll i saradnici [115] su sproveli studiju na 70 pedijatrijskih pacijenata sa rekurentnim i hroničnim otitisom i 70 kontrolnih pacijenata. Pacijenti su bili uglavnom bele rase, (66% pacijenata, i 69% kontrola). Njihova poređenja prevalencije polimorfizama kod TLR 2 i 4, između eksperimentalne i kontrolne grupe nisu pokazala statistički značajnu razliku. Ustanovljeni su AG heterozigoti TLR 2 (Arg753Gln, rs5743708) kod ispitanika u 1% eksperimentalnoj i u 7% slučajeva u kontrolnoj grupi. Nije bilo detektovanih AA homozigota. Kod TLR 4 (Thr399Ile, rs4986791), bilo je 11% heterozigota CT u eksperimentalnoj i 10% u kontrolnoj grupi.

Svi naši pacijenti su bili bele rase. Što se tiče polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2, u eksperimentalnog grupi je bilo 72,9% ispitanika G/G homozigota, u odnosu na kontrolnu grupu u kojoj se nalazilo 96% G/G homozigota. U eksperimentalnoj grupi se nalazilo i 11,76% A/G heterozigota i 15,3% A/A homozigota, dok je u kontrolnoj grupi bilo 4% A/G heterozigota i nije bilo AA homozigota. Statistički značajna razlika između grupa je postojala. Frekvencija genotipova polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2 je bila značajno različita kod pacijenata sa granuliranom sluznicom u odnosu na polipoznu sluznicu ( $p=0.03$ ) i na perimatrikso holesteatoma ( $p=0.01$ ). Ispitivani polimorfizam Arg753Gln u genu za TLR 2 se nije pokazao kao statistički značajan faktor za javljanje bilo koje vrste patološkog procesa sluznice u pacijentima sa HOM.

Takođe, nije bio statistički značajan prognostički faktor za javljanje komplikacija kod pacijenata sa HOM.

Što se tiče polimorfizma Thr399Ile u genu za TLR 4, u eksperimentalnoj grupi je bilo 92,9% ispitanika sa CC homozigota (u odnosu na kontrolnu grupu u kojoj se nalazilo 100% CC homozigota). U eksperimentalnoj grupi se nalazilo i 7,1% CT heterozigota, dok u kontrolnoj grupi nije bilo CT heterozigota. Statistički značajna razlika između grupa je postojala. Razlika između pojedinih podgrupa pacijenata sa različitim patološkim promenama sluznice je postojala, ali samo između uzoraka sa perimatriksom i matriksom holesteatoma ( $p=0,000$ ). Ispitivani polimorfizam Thr399Ile u genu za TLR 4 se nije pokazao kao statistički značajan faktor za javljanje bilo koje vrste patološkog procesa sluznice u pacijentima sa HOM. Takođe, nije bio statistički značajan prognostički faktor za javljanje komplikacija kod pacijenata sa HOM, niti za podložnost infekciji različitim bakterijskim agensima. S obzirom da se radi o malom uzorku, posebno o malom broju pacijenata sa različitim patološkim promenama sluznice kod HOM, podaci se moraju pažljivo tumačiti. U svakom slučaju, postoji indikacije da polimorfizmi ispitivanih gena ukazuju na podložnost HOM, dok podaci sličnih studija u literaturi govore za i protiv ove povezanosti. Trebalo bi studiju proširiti na veći broj pacijenata da bi mogli govoriti sa statističkom sigurnošću o uzročnoj posledičnoj vezanosti ova dva polimorfizma i HOM.

### **Imunohistohemijska ekspresija TLR 2 i TLR 4 u sluznici srednjeg uva**

Neki autori smatraju da je različit obrazac ekspresije TLR 2 i TLR 4 na raznim anatomskim lokalizacijama rezultat adaptacije početnog imunskog odgovora na bakterijsku floru (koja je specifična za datu anatomsku lokalizaciju). [116] Ekspresija TLR 2 i 4 je izražena u zdravoj mukozi srednjeg uva, Eustahijeve tube, nazofarinksa i usne duplje kod pacova, ali je najveća na sluznici srednjeg uva. Koncentracija iRNK TLR2 je bila značajno veća nego iRNK TLR 4 na svim anatomskim subregionima. [53] Izbor TLR-a u ovoj studiji je bio baziran na ovim rezultatima i dokumentovanoj aktivnosti TLR 2 i 4 nakon izloženosti gram-negativnim bakterijama. [61, 117, 118] Povećana ekspresija TLR u srednjem uvu može igrati ulogu u obezbeđivanju sterilnih uslova, i istovremeno odbranu od bakterijske infekcije. Početni imunitet stvara visoko efektivnu barijeru protiv patogena i pomaže u održavanju sterilnosti srednjeg uva. [54]

Imunohistohemijski dokazana ekspresija TLR2 na sluznici pacijenata eksperimentalne grupe je bila značajno različita u odnosu na kontrolnu grupu, gde ekspresije nije ni bilo ( $p=0,000$ ). Što se tiče edematozne sluznice, pretežno je pokazala negativnu ekspresiju i ekspresiju lakog stepena. Polipozna sluznica je pokazala u najvećem broju slučajeva ekspresiju lakog stepena, dok je granulirana sluznica pokazala isključivo ekspresiju umerenog i jakog stepena. Matriks holesteatoma je pokazao negativnu ekspresiju i ekspresiju lakog stepena, dok je perimatriks holesteatoma pokazao ekspresiju umerenog i jakog stepena. Poređenja među grupama su otkrila da postoji statistički značajna razlika (Mann-Whitney test,  $p=0,000$ ) između svih ispitivanih grupa, osim između edematozne i polipozne sluznice, polipozne sluznice i matriksa holesteatoma i granulirane sluznice i perimatriksa holesteatoma. Imunohistohemijski dokazana ekspresija TLR 4 na sluznici pacijenata eksperimentalne grupe je bila značajno različita u odnosu na kontrolnu grupu, gde ekspresije nije ni bilo ( $p=0,000$ ). Što se tiče edematozne sluznice, pokazala je negativnu ekspresiju, ali i ekspresiju lakog i umerenog stepena. Polipozna sluznica je pokazala u najvećem broju slučajeva ekspresiju lakog stepena, dok je granulirana sluznica pokazala isključivo ekspresiju jakog stepena. Matriks holesteatoma je pokazao negativnu ekspresiju i ekspresiju lakog stepena, dok je perimatriks holesteatoma pokazao ekspresiju umerenog i jakog stepena. Poređenja među grupama su otkrila da postoji statistički značajna razlika (Mann-Whitney test,  $p<0,05$ ) između svih ispitivanih grupa, osim između edematozne i polipozne sluznice, polipozne sluznice i matriksa holesteatoma. Imunohistohemijska ekspresija TLR 2 i 4 nije statistički predviđajući faktor za javljanje komplikacija hroničnih otitisa.

Malobrojne su studije ovog tipa sprovedene na pacijentima koji boluju hroničnog otitisa sa i bez holesteatoma. Szczepanski i saradnici, na čijem smo metodu ocene imunohistohemijskog bojenja zasnovali našu metodologiju, sproveli su studiju na 15 pacijenata sa holesteatomom i 5 kontrolnih uzoraka neinflamirane kože. [85] Između ostalih, ispitivana je koekspresija TLR 2 i 4. TLR su dokazani u matriksu i perimatriksu holesteatoma. U perimatriksu aktivnost je nađena na brojnim T ćelijama i malo makrofaga, dok je ekspresija TLR na matriksu bila oskudna i fokalna. Ekspresije TLR nije bilo, ili je bila slaba na kontrolnim uzorcima. Ekspresija TLR2 je bila umerenog i jakog stepena u 14 slučajeva, dok je TLR4 ekspresija bila umerenog i jakog stepena u 3 slučaja.

Granath i saradnici [87] su predstavili 6 receptora za prepoznavanje obrazaca (Pattern Recognition Receptors, PRRs) u srednjem uvu kod ljudi, od kojih su četiri TLR 3, 4, 5 i 7. Sluznica

srednjeg uva je analizirana za ekspresiju iRNK korišćenjem RT PCR analizom, a ekspresija TLR na sluznici je imunohistohemijski dokazana antitelima TLR 3, 4, 5 i 7. Bilo je značajnih razlika između njihovih ekspresija kod pacijenta sa hroničnim otitisom i kod ispitanika iz kontrolne grupe. Mana ove studije je to što pacijenti nisu deljeni u posebne grupe prema tipu hroničnog otitisa, tako da nije poznato o kakvim se patološkim promenama sluznice radi. Uzorci koji su uzimani su bili, kako autori opisuju, bez makroskopskih znakova infekcije, ali nisu rađene bakteriološke pretrage uzoraka u smislu određivanja bakterijske flore. Rezultati jasno ukazuju da regulacije opisanih TLR igra ulogu u patogenezi hroničnih otitisa.

Hronična infekcija gram-negativnim bakterijama takođe aktivira TLR 4 asociране signalne kaskade. Posledični imunski odgovor je modifikovan ponavljanim i hroničnim izlaganjem bakterijskim LPS. Fan i Cook pominju stanje koje se naziva „LPS tolerancija”, gde ponavljano izlaganje ćelija koje imaju ekspresiju TLR 4 lipopolisaharidima dovodi do slabijeg imunog odgovora u dužem periodu. [118]

Prisustvo limfocita, plazma ćelija i histiocita, sa fibroblastima i dobrom vaskularizacijom, detektovana u granuliranoj sluznici znak je hronične inflamacije. [119] Sa druge strane, edematozna sluznica i polipoidna sluznica mogu biti jako edematozne sa malo fibrocita i sa hroničnim inflamatornim ćelijama (plazmociti, limfociti). U našoj studiji, pacijenti sa edematoznom sluznicom su pokazali nisku ekspresiju i TLR 2 i 4, sa oskudnim stromalnim ćelijama, retkim polimorfonuklearima i makrofagima. Kod pacijenata sa polipoidnom sluznicom, identifikovani su makrofagi i plazma ćelije, sa ekspresijom lakog i umerenog stepena u plazma ćelijama. Kod pacijenata sa perimatriksom holesteatoma, identifikovani makrofagi su pokazali ekspresiju umerenog i jakog stepena TLR 2 i 4. Ekspresija jakog stepena je identifikovana kod pacijenata sa granuliranom sluznicom pretežno zbog citoplazmatske imunoreaktivnosti plazmocita.

Hirai i saradnici su na 12 ispitivanih pacijenata dokazali jaku ekspresiju TLR 2 i 4 na sluznici i inflamatornim ćelijama u hroničnom otitisu sa i bez holesteatoma. Značajno veća ekspresija TLR2 i 4 je zapažena kod holesteatoma, nego kod kontrolnih uzoraka sluznice. Korišćen je sličan metod procene imunohistohemijskog bojenja kao i u našoj studiji. Pozitivna ekspresija TLR4 je zapažena u ćelijama epitela, inflamatornim ćelijama i makrofagima, dok je ekspresija TLR2 zapažena u ćelijama epitela i inflamatornim ćelijama. [86]

Song i saradnici veruju da je srednje uvo imunološki dinamična lokalizacija, i da je početni imunitet klučan u zaštiti od bakterijske infekcije i održavanju funkcije srednjeg uva. [53] Ove



tvrdnje su delimično potvrđene i u našoj studiji. Početni imunski odgovor je zavisio od tipa i težine patoloških promena sluznice. Jaka reakcija sluznice sa visokom ekspresijom TLR 2 i 4 je zabeležena kod uzoraka perimatriksa holesteatoma i granulirane sluznice. Neki autori tvrde da HOM ima infektivno poreklo, bez obzira na klinički izgled promena i individualnu genetičku nesposobnost ekspresije TLR. [83,87] Rezultati ove studije podržavaju takve tvrdnje, što govori u prilog tome da je HOM multifaktorijalna bolest o kojoj i dalje učimo.

# ***ZAKLJUČAK***

---

## **ZAKLJUČAK**

Na osnovu analiziranih podataka iz ove studije možemo zaključiti sledeće:

1. Starosna dob pacijenta nije uticala ni na pojavu komplikacija kod hroničnih otitisa, niti na ekspresiju TLR2 i TLR4 u patološki izmenjenoj sluznici srednjeg uva kod pacijenata sa HOM
2. Javljanje komplikacija kod pacijenata uključenih u studiju nije zavisilo od starosti pacijenta, od vrste bakterijskog uzročnika, učestalosti polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2 i polimorfizma Thr399Ile u genu za TLR4, kao ni od ekspresije TLR2 i TLR4 na patološki izmenjenoj sluznici srednjeg uva
3. Vrsta izolovanog bakterijskog uzročnika nije bila povezana sa učestalošću polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2 i polimorfizma Thr399Ile u genu za TLR4, kao ni sa ekspresijom TLR2 i TLR4 na patološki izmenjenoj sluznici srednjeg uva
4. Učestalost polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2 je značajno veća u ekperimentalnoj grupi pacijenata sa hroničnim otitisom nego u kontrolnoj grupi.
5. Utvrđena je značajna asocijacija polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2 sa različitim patološkim promenama sluznice u okviru grupe hroničnih otitisa bez holesteatoma.

6. Postoji jaka povezanost i zavisnost ekspresije TLR 2 i 4 dokazane imunohistohemijskim bojenjem, i različitih tipova patološki izmenjene sluznice srednjeg uva kod hroničnog otitisa

Ovom studijom smo doprineli teoriji postojanja genetske komponente u patogenezi hroničnog otitisa, i dokazali da je stepen promene sluznice srednjeg uva u različitim formama hroničnog otitisa indikator aktivnosti TLR-a. Ova saznanja mogu pokrenuti druga istraživanja u oblasti početnog imuniteta, a u cilju bližeg objašnjavanja patogeneze hroničnog otitisa, kao kompleksne multifaktorijalne bolesti.

# *LITERATURA*

---

## ***LITERATURA***

1. Rovers MM, Schilder AG, Zielhuis GA, Rosenfeld RM. Otitis media. *Lancet*. 2004; 363(9407):465-73
2. Rosenfeld RM, Bluestone CD. Evidence –based otitis media, Second edition, 2003, BC Decker Inc. London. P 147-62, p429-37
3. Klein JO. The burden of otitis media. *Vaccine* 2000; 19:2-8
4. Snow JB, Wackym PA, Ballenger JJ. *Ballenger's Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery* PMPH-USA, 2009.
5. Wright CG, Meyerhoff, WL. Pathology of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994;103:24–7
6. Jahn AF, Farkashidy J. Newer perspectives on the pathology of chronic otitis media. *J Otolaryngol* 1980;9:131–42
7. Brewster DR. Management of chronic suppurative otitis media. *Med J Aust* 180 (2): 91–3. 2004
8. Cummings CW, Haughey BH, Thomas JR, Harker LA, Flint PW. *Cummings Otolaryngology: Head and Neck Surgery*, Fourth edition, 2005, Mosby Inc, Philadelphia, Pennsylvania
9. Harker LA, Koontz FP: The bacteriology of cholesteatoma. In McCabe BF, Sade J, Abramson M, editors: *Cholesteatoma First International Conference*, Birmingham, Alabama, 1977, Aesculapius
10. Kvestad E, Kvaerner KJ, Røysamb E, Tambs K, Harris JR, Magnus P. Otitis media: genetic factors and sex differences. *Twin Res*. 2004; 7(3):239-44
11. Kvestad E, Kvaerner KJ, Røysamb E, Tambs K, Harris JR, Magnus P. Recurrent otitis media and tonsillitis: common disease predisposition. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2006;70(9):1561-8
12. Fearon, DT. Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*. 1996; 272:50–3
13. Janeway CAJ. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*. 1992; 13:11–6

14. Medzhitov R, Janeway CAJ. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 1997; 91:295–8
15. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996; 86: 973–83
16. Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode transmembrane protein. *Cell* 1988; 52:269–79.
17. Tauszig, S, Jouanguy E, Hoffmann JA, Imler JL. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97:10520–5
18. Nomura N, Miyajima N, Sazuka T, Tanaka A, Kawarabayasi Y, Sato S, Nagase T, Seki N, Ishikawa K, Tabata S. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res*. 1994; 1 (1): 27–35
19. Taguchi T, Mitcham JL, Dower SK, Sims JE, Testa JR. Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics*. 1996; 32 (3): 486–8
20. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CAJ. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388:394–7
21. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*. 1998; 282:2085–8
22. Chuang TH, Ulevitch RJ. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur. Cytokine Netw*. 2000; 11(3): 372–8
23. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101 (10): 3516–21

24. Shizuo Akira, Satoshi Uematsu, Osamu Takeuchi. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 2006; 124:783–801
25. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*. 2002; 14(1):103-10
26. Blander JM, Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science*. 2004; 304, 1014-18
27. Yates RM, Russell DG. (2005) Phagosome maturation proceeds independently of stimulation of toll-like receptors 2 and 4. *Immunity* 23, 409–417
28. Bowie A, O'Neill LAJ. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J. Leukoc. Biol*. 2000; 67: 508–14
29. Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2001; 167(3):1609-16
30. Shigeoka AA, Holscher TD, King AJ, Hall FW, Kiosses WB, Tobias PS, Mackman N, McKay DB. TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J. Immunol*. 2007; 178 (10): 6252–8
31. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol*. 2003; 4 (11): 1144–50
32. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2004; 420 (6913): 324–9
33. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010; 11(5):373-84
34. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*. 2001, 413:78-8



35. Horng T, Barton GM, Medzhitov R: TIRAP, an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001; 2:835-41
36. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:446–58
37. Platt N, da Silva RP, Gordon S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol.* 1998; 8:365–72
38. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med.* 1999; 5:1249–55
39. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 191:423–34
40. Drexler SK, Foxwell BM. The role of toll-like receptors in chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42(4):506-18
41. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat. Immunol.* 2004; 5: 975–9
42. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A: The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, 97:13766-71
43. Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, Landmann R. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J. Infect. Dis.* 2002; 186, 798– 806
44. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2- deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol.* 2000; 165, 5392–6
45. Shuto T, Xu H, Wang B, Han J, Kai H, Gu XX, Murphy TF, Lim DJ, Li JD. Activation of NF-kappa B by nontypeable *Hemophilus influenzae* is mediated by Toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK alpha/beta-I kappa B alpha and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8774–79

46. Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med.* 2007; 39: 421–38,
47. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defense. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 179–90
48. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* 1999; 162:3749-52
49. Kitchens RL (2000). Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. *Chem. Immunol. Chemical Immunology and Allergy* 74: 61–82
50. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010; 11 (5): 373-84
51. Pioli PA, Amiel E, Schaefer TM, Connolly JE, Wira CR, Guyre PM. Differential expression of toll-like receptors 2 and 4 in tissues of the human female reproductive tract, *Infect. Immun.* 2004; 72:5799–806
52. Cohen R, Levy C, Hentgen V, Boucherat M, de La Rocque F, d'Athis P, Bingen E. Relationship between clinical signs and symptoms and nasopharyngeal flora in acute otitis media. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006; 12: 679–82
53. Song JJ, Cho JG, Woo JS, Lee HM, Hwang SJ, Chae SW. Differential expression of toll like receptors 2 and 4 in rat middle ear. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009; 73(6): 821-4
54. Lim DJ, Chun YM, Lee HY, Moon SK, Chang KH, Li JD, Andalibi A. Cell biology of tubotympanum in relation to pathogenesis of otitis media—a review. *Vaccine.* 2000; 19: 17–25
55. Wang X, Moser C, Louboutin JP, Lysenko ES, Weiner DJ, Weiser JN, Wilson JM. Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. *J. Immunol.* 2002; 168: 810–15
56. Hirano T, Kodama S, Fujita K, Maeda K, Suzuki M. Role of Toll-like receptor 4 in innate immune responses in a mouse model of acute otitis media. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007; 49(1):75-83
57. Frick AG, Joseph TD, Pang L, Rabe AM, St.Geme III JW, Look DC. *Haemophilus influenzae* stimulates ICAM-1 expression on respiratory epithelial cells. *J Immunol.* 2000; 164: 4185–96

58. Fan J, Frey RS, Malik AB. TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *J Clin Invest.* 2003; 112: 1234–43
59. Leichtle A, Hernandez M, Pak K, Yamasaki K, Cheng CF, Webster NJ, Ryan AF, Wasserman SI. TLR4-mediated induction of TLR2 signaling is critical in the pathogenesis and resolution of otitis media. *Innate Immun.* 2009; 15:205-15
60. Lorenz E, Chemotti DC, Jiang AL, McDougal LD. Differential involvement of Toll-like receptors 2 and 4 in the host response to acute respiratory infections with wild-type and mutant *Haemophilus influenzae* strains. *Infect Immun.* 2005; 73: 2075–82
61. Bogaert D, de Groot R, Hermans PWM, Streptococcus pneumonia colonisation: the key to pneumococcal disease, *Lancet.* 2004; 4: 144-54
62. Berry AM, Alexander JE, Mitchell TJ, Andrew PW, Hansman D, Paton JC. Effect of defined point mutations in the pneumolysin gene on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1995; 63:1969-74
63. Braun JS, Novak R, Gao G, Murray PJ, Shenep JL. Pneumolysin, a protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*, induces nitric oxide production from macrophages. *Infect. Immun.* 1999; 67:3750–6
64. Houldsworth S, Andrew PW, Mitchell TJ. Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun.* 1994; 62:1501-3
65. Han F, Yu H, Tian C, Li S, Jacobs MR, Benedict-Alderfer C, Zheng QY. Role for Toll-like receptors in the immune response to *Streptococcus pneumoniae* infection in mouse otitis media. *Infect Immun* 2009; 77: 3100–8.
66. Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:1966-71
67. Faden H, Hong J, Murphy T. Immune response to outer membrane antigens of *Moraxella catarrhalis* in children with otitis media. *Infect Immun* 1992; 60: 3824–9
68. Xie H, Gu XX. *Moraxella catarrhalis* lipooligosaccharide selectively upregulates ICAM-1 expression on human monocytes and stimulates adjacent naive monocytes to produce TNF-a through cellular cross-talk. *Cell Microbiol* 2008; 10: 1453–67

69. Schaar V, de Vries SP, Perez Vidakovic ML, Bootsma HJ, Larsson L, Hermans PW, Bjartell A, Mörgelin M, Riesbeck K. Multicomponent *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles induce an inflammatory response and are internalized by human epithelial cells. *Cell Microbiol* 2001; 13: 432–49
70. Hassan F, Ren D, Zhang W, Merkel TJ, GuXX. *Moraxella catarrhalis* activates murine macrophages through multiple toll like receptors and has reduced clearance in lungs from TLR4 mutant mice. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e37610
71. Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat Immunol*. 2002; 3:354–9
72. Flo TH, Ryan L, Latz E, Takeuchi O, Monks BG, Lien E, Halaas O, Akira S, Skjåk-Braek G, Golenbock DT, Espevik T. Involvement of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in cell activation by mannuronic acid polymers. *J Biol Chem*. 2002; 277: 35489–95
73. Epelman S, Stack D, Bell C, Wong E, Neely GG, Krutzik S, Miyake K, Kubes P, Zbytnuik LD, Ma LL, Xie X, Woods DE, Mody CH. Different domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S activate distinct TLRs. *J Immunol* 2004; 173: 2031–40
74. Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, Prince A. *P. aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and Toll-like receptor 2 as well as Toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30: 627–34
75. Skerrett SJ, Wilson CB, Liggitt HD, Hajjar AM. Redundant Toll-like receptor signaling in the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 292:312-22
76. Skerrett SJ, Liggitt HD, Hajjar AM, Wilson CB. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 is essential for pulmonary host defense against *Pseudomonas aeruginosa* but not *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 2004; 172: 3377–81
77. Onofrio JM, Toews GB, Lipscomb MF, Pierce AK. Granulocytealveolar macrophage interaction in the pulmonary clearance of *Staphylococcus aureus*. *Am. Rev. Respir. Dis*. 1983; 127:335-41
78. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 588–93

79. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 2000; 25: 187–91
80. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the Toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun.* 2000; 68: 6398–401
81. Schroder NW, Hermann C, Hamann L, Gobel UB, Hartung T, Schumann RR. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor- 2 gene detected by a novel allele-specific PCR. *J Mol Med.* 2003; 81:368-72
82. Vuononvirta J, Toivonen L, Gröndahl-Yli-Hannuksela K, Barkoff AM, LindholmL, MertsolaJ, PeltolaV, HeQ.Nasopharyngeal bacterial colonization and gene polymorphisms of mannose-binding lectin and toll like receptors2 and 4 in infants.PLoS One. 2011; 6(10):e26198
83. Emonts M, Veenhoven RH, Wiertsema SP, Houwing DuistermaatJJ, WalravenV, deGrootR, HermansPW, SandersEA.Genetic polymorphisms in immunoresponse genes TNFA, IL6, IL10, and TLR4 are associated with recurrent acuteotitis media.Pediatrics. 2007; 120(4):814-23
84. Lee YC, Kim C, Shim JS, Byun JY, Park MS, Cha CI, Kim YI, Lee JW, Yeo SG.. Toll-like Receptors 2 and 4 and their mutations in patients with otitis media and middle ear effusion. *Clin Exper Otorhinolaryngol* 2008; 4:189-95
85. Szczepański M, Szyfter W, Jenek R, Wróbel M, Lisewska IM, Zeromski J. Toll-like receptors 2, 3 and 4 (TLR-2, TLR-3 and TLR-4) are expressed in the microenvironment of human acquired cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006; 263:603–7
86. Hirai H, Kariya S, Okano M, Fukushima K, Kataoka Y, Maeda Y, Nishizaki K. Expression of toll-like receptors in chronic otitis media and cholesteatoma. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2013; 77(5):674-6
87. Granath A, Cardell LO, Uddman R, Harder H. Altered Toll- and Nod-like receptor expression in human middle ear mucosa from patients with chronic middle ear disease *J Infect.* 2011; 63(2):174-6
88. Monasta L, Ronfani L, Marchetti F, Montico M, Vecchi Brumatti L, Bavcar A, Grasso D, Barbiero C, Tamburlini G. Burden of disease caused by otitis media: systematic review and global estimates. *PLoS One.* 2012; 7(4):e36226

89. Acuin J. Chronic suppurative otitis media - Burden of Illness and Management Options. Geneva: World Health Organization, 2004
90. Sharma K, Aggarwal A, Mohan SP, Khurana PM, Comparison of bacteriology in bilaterally discharging ears in chronic suppurative otitis media, *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2010; 62:153–157
91. Teele DW, Klein JO, Chase C, Menyuk P, Rosner BA. Otitis media in infancy and intellectual ability, school achievement, speech, and language at age 7 years. Greater Boston Otitis Media Study Group. *J Infect Dis.* 1990; 162: 685–694
92. Arlinger S, Lunner T, Lyxell B, Pichora-Fuller MK (2009) The emergence of cognitive hearing science. *Scand J Psychol* 50: 371–384. Williams CJ, Jacobs AM. The impact of otitis media on cognitive and educational outcomes. *Med J Aust.* 2009; 191: 69–72
93. Vergison A, Dagan R, Arguedas A, Bonhoeffer J, Cohen R, Dhooge I, Hoberman A, Liese J, Marchisio P, Palmu AA, Ray GT, Sanders EA, Simões EA, Uhari M, van Eldere J, Pelton SI. Otitis media and its consequences: beyond the earache. *Lancet Infect Dis.* 2010;10: 195–203
94. Tahira M, Mohammed A M, Gulnaz K, Mustafa K. Pseudomonas aeruginosa in chronic suppurative otitis media: Sensitivity spectrum against various antibiotics in Karachi. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2009; 21(2):120-123
95. Yeo SG, Park DC, Hong SM, Cha CI, Kim MG. Bacteriology of chronic suppurative otitis media-a multicentre study. *Acta Otolaryngol* 2007; 127:1062– 67
96. Ibekwe AO. Chronic suppurative otitis media in Nigerian children. *J. Paediatrics.* 1985; 12:17-19
97. Afolabi OA, Salaudeen AG, Ologe FE, Nwabuisi C, Nwawolo CC. Pattern of bacterial isolates in the middle ear discharge of patients with chronic suppurative otitis media in a tertiary hospital in North central Nigeria. *Afr Health Sci.* 2012; 12(3):362-7
98. Ricciardiello F, Cavaliere M, Mesolella M, Iengo M. Notes on the microbiology of cholesteatoma: clinical findings and treatment. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2009; 29(4):197-202
99. Madana J, Yolmo D, Kalaiarasi R, Gopalakrishnan S, Sujatha S. Microbiological profile with antibiotic sensitivity pattern of cholesteatomatous chronic suppurative otitis media among children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011; 75(9):1104-8
100. Brook I, Aerobic and anaerobic bacteriology of cholesteatoma, *Laryngoscope* 1981; 91: 250–3

101. Aygagari A, Pancholi VK, Goswami A, Agarwal KC, Mehra YN. Anaerobic bacteria in chronic suppurative otitis media. *Indian J Med Res* 1981; 73: 860-4
102. Yorgancılar E, Yildirim M, Gun R, Bakir S, Tekin R, Gocmez C, Meric F, Topcu I. Complications of chronic suppurative otitis media: retrospective review. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013; 270(1):69–76
103. Kangsanarak J, Navacharoen N, Fooanant S, Ruckphaopunt K. Intracranial complications of suppurative otitis media: 13 years' experience. *Am J Otol.* 1995; 16(1):104–9
104. Mustafa A, Heta A, Kastrati B, Dreshaj Sh. Complications of chronic otitis media with cholesteatoma during a 10-year period in Kosovo. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008; 265(12):1477–82
105. Greenberg JS, Manolidis S. High incidence of complications encountered in chronic otitis media surgery in a U.S. metropolitan hospital. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001; 125:623–627
106. Yüce S, Polat K, Onder I, Doğan M, Müderris S. Chronic otitis media with multiple complication. *J Craniofac Surg.* 2013; 24(4):403–5
107. Kaftan H, Draf W. Intracranial otogenic complications: in spite of therapeutic progress still a serious problem. *Laryngorhinootologie.* 2000; 79:609–15
108. Baysal E, Erkutlu I, Mete A, Alptekin M, Oz A, Karataş ZA, Celenk F, Mumbuc S, Kanlikama M. Complications and treatment of chronic otitis media. *J Craniofac Surg.* 2013; 24(2): 464–7
109. Sun J, Sun J. Intracranial complications of chronic otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013. E-pub ahead of print
110. Osma U, Cureoglu S, Hosoglu S. The complications of chronic otitis media: report of 93 cases. *J Laryngol Otol.* 2000; 114:97–100
111. Ospelt C, Gay S. TLRs and chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42(4):495-505
112. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001; 2(8):675-80
113. Kutukculer N1, Yeniay BS, Aksu G, Berdeli A. Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor-2 gene in children with recurrent febrile infections. *Biochem Genet.* 2007; 45:507-14

114. Vandermeer J, Sha Q, Lane AP, Schleimer RP. Innate immunity of the sinonasal cavity: expression of messenger RNA for complement cascade components and toll-like receptors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 130:1374-80
115. Carroll SR, Zald PB, Soler ZM, Milczuk HA, Trune DR, MacArthur CJ. Innate immunity gene single nucleotide polymorphisms and otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2012; 76:976-9
116. Pioli PA, Amiel E, Schaefer MT, Connolly EJ, Wira RC, Guyre MP. Differential Expression of Toll-Like Receptors 2 and 4 in Tissues of the Human Female Reproductive Tract. *Infect Immun.* 2004; 72:5799-806
117. Zhuang L, Jung JY, Wang EW, Houlihan P, Ramos L, Pashia M et al. Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide induces osteoclastogenesis through a toll-like receptor 4 mediated pathway in vitro and in vivo. *Laryngoscope.* 2007; 117: 841-7
118. Fan H, Cook JA. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance, *J. Endotoxin Res.* 2004; 10: 71-84
119. Salvinelli F, Trivelli M, Greco F, Linthicum FH Jr. Chronic otitis media: histopathological changes: a post mortem study on temporal bones. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 1999; 3: 175-8



# ***BIOGRAFIJA***

---

## ***BIOGRAFIJA***

Ana Jotić je rođena 21.03.1979. godine u Kruševcu u porodici lekara. Završila je Gimnaziju u Kruševcu 1998, posle čega je upisala Medicinski fakultet u Beogradu. Fakultet je završila 2004. sa prosečnom ocenom 9,37. Magistrirala je na Medicinskom fakultetu u Beogradu 2009. iz oblasti otorinolaringologije na temi *Analiza funkcionalnih rezultata lečenja početnih karcinoma glotisne regije larinksa*. Tokom osnovnih i magistarskih studija bila je stipendista Fonda za Mlade talente republike Srbije, kao i Fonda za talente grada Kruševca.

Specijalista je otorinolaringologije, i zapošljena je na Klinici za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju Kliničkog Centra Srbije od 2008. Od 2012. Radi kao klinički asistent na Katedri za Otorinolaringologiju sa Maksilofacijalnom hirirgijom Medicinskog fakulteta u Beogradu. Autor je mnogih autorskih i ko-autorskih naučnih radova iz oblasti otorinolaringologije.

## ***SKRAĆENICE***

A-Adenin

ANOVA -Jednosmerna analiza varijanse  
APĆ- Antigen prezentujuće ćelije  
C- Citozin  
CD14- Cluster of differentiation 14  
DAB- Diaminobenzidin  
DĆ- Dendritične ćelije  
DNK- Dezoksiribonukleinska kiselina  
dNTP- deoksinukleozid trifosfat  
dsRNK- RNK dvostrukog lanca  
EDTA- Etilendiamintetraacetična kiselina  
G- Guanin  
GIT- Gastrointestinalni trakt  
Gp96- Tumor rejection antigen Gp 96  
HOM- Hronični otitis media  
Hsp60- Heat shock protein 60  
Hsp70- Heat shock protein 60  
ICAM- Intercellular adhesion molecule-1  
IFN-1- tip I interferon  
Ig- Imunoglobulin  
IHH analiza- Imunohistohemijska analiza  
IKK $\beta$ - Inhibitor nuclear factor kappa-B kinase  
I $\kappa$  $\beta$ - Inhibitor kappa-B kinase  
IL-13- Interleukin 13  
IL-1R- Interleukin receptor 1  
IL-4- Interleukin-4  
INF-g- Interferon-g  
IRAK- Interleukin-1 receptor-associated kinase  
IRF3- Interferon regulatory factor 3  
LOS- Lipooligosaharidi  
LPS- Lipopolisaharidi  
LPS-vezujući protein- LPS-Binding Protein

LRR- Leucin-rich repeats  
LSAB- Labeled Streptavidin Biotin  
LTA- Lipoteiholična kiselina (eng. lipoteichoic acid)  
MANOVA- Multivarijantna analiza varijanse  
MAPK- Mitogen-activated protein kinase  
MD-2 protein- Mijeloidni diferencirajući faktor 2  
MFH- Maksilofacijalna hirurgija  
MyD88- Myeloid differentiation primary response gene 88  
NADPH oksidaza- Nikotinamid adenin dinukleotide fosfat oksidaza  
NF $\kappa$ B- Nuclear factor kappa-B kinase  
NF- $\kappa$ B- Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
NK ćelije- Natural killer ćelije  
ORL-Otorinolaringologija  
PAMP- Pathogen-associated molecular patterns  
PG- Peptidoglikan  
PPR- Pattern-recognition receptors  
PRR- Pattern recognition receptors  
RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism  
RIP1- Receptor-interacting protein 1  
RNK- Ribonukleinska kiselina  
SNP- Single nucleotide polymorphism  
ssRNK- RNK jednostrukog lanca  
TAK1- (TGF)- $\beta$  activated kinase-1  
Taq- Termostabilna DNK polimeraza  
TBK1- Serine/threonine-protein kinase 1  
TGF - Transforming Growth Factor  
Th1- T helper 1  
Th2- T helper 2  
TIR domen- Toll/IL-1R domen  
TIRAP/Mal- TIR domain-containing adaptor protein/MyD88-adaptor-like  
TLR- Toll-like receptor

TNF receptor- Tumor necrosis factor receptor

TNF- $\alpha$ - Tumor necrosis factor alpha

TRAF6 - TNF receptor asociirajući factor 6

TRIF- TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$

T-Timin

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisana **Ana D. Jotić**

Broj upisa:

IZJAVLJUJEM


da je doktorska teza pod naslovom

**Značaj ekspresije i polimorfizama receptora sličnih Toll-u 2 i 4 u zapaljenskim oboljenjima srednjeg uva i njihovim komplikacijama**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica

U Beogradu, 29.05.2014.

Potpis doktoranta



Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Ana D. Jotić**

Broj upisa:

Studijski program:

Naslov rada: **Značaj ekspresije i polimorfizama receptora sličnih Toll-u 2 i 4 u zapaljenskim oboljenjima srednjeg uva i njihovim komplikacijama**

Mentor: Prof. Dr Snežana Ješić

Potpisana Ana D. Jotić

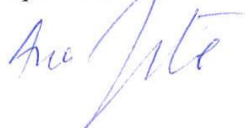
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 29.05.2014.

Potpis doktoranta



Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković” da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**Značaj ekspresije i polimorfizama receptora sličnih Toll-u 2 i 4 u zapaljenskim oboljenjima srednjeg uva i njihovim komplikacijama**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koji sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo-nekomercijalno
3. Autorstvo- nekomercijalno-bez prerade
4. Autorstvo- nekomercijalno-deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo-bez prerade
6. Autorstvo- deliti pod istim uslovima

U Beogradu, 29.05.2014.

Potpis doktoranta

