



RĪGAS STRADIŅA  
UNIVERSITĀTE

Kristaps Dambergs

ORCID 0000-0001-7012-6512

Cilvēka iegūtas  
holesteatomas audu pārmaiņu  
ontogēnētiskais raksturojums

Promocijas darba kopsavilkums zinātnes doktora grāda  
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – klīniskā medicīna

Apakšnozare – otorinolaringoloģija

Rīga, 2024

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūta Morfoloģijas katedrā un Otorinolaringoloģijas katedrā

Promocijas darba vadītājas:

*Dr. med.* docente **Gunta Segliņa**,  
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

*Dr. med., Dr. habil. med.* profesore **Māra Pilmane**,  
Rīgas Stradiņa universitāte, Anatomijas un antropoloģijas institūts, Latvija

Oficiālie recenzenti:

*Dr. med.* docente **Anna Junga**,  
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

*Dr. med. vet.* profesors **Ilmārs Dūrītis**,  
Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte

*Dr. med.* profesors **Eugenijus Lesinskas**,  
Viļņas Universitāte, Lietuva

Promocijas darbs tiks aizstāvēts Rīgas Stradiņa universitātes Klīniskās medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē 2024. gada 11. decembrī plkst. 13.30 attālināti, tiešsaistes platformā *Zoom*

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:  
<https://www.rsu.lv/promocijas-darbi>

Promocijas padomes sekretāre:

*Dr. med.* docente **Anna Junga**

## Satura rādītājs

Darbā izmantotie saīsinājumi.....	5
Ievads.....	6
Darba mērķis.....	8
Darba uzdevumi.....	8
Darba hipotēze.....	9
Darba novitāte.....	9
1. Materiāls un metodes.....	10
1.1. Pētāmais materiāls un pacientu iedalījums grupās.....	10
1.1.1. Kontroles grupa.....	10
1.1.2. Bērnu pacientu grupa.....	11
1.1.3. Pieaugušo pacientu grupa.....	14
1.2. Izmeklēšanas metodes.....	17
1.2.1. Audu iegūšana un sagatavošana krāsošanai.....	17
1.2.2. Rutīnas histoloģijas krāsošanas metode.....	18
1.2.3. Imūnhistoķīmiskā (biotīna-streptavidīna) izmeklēšanas metode un reaģenti.....	19
1.3. Datu uzskaites un apstrādes metodes.....	22
1.3.1. Datu vizuālais izvērtējums.....	22
1.3.2. Datu statistiskās apstrādes metodes.....	22
2. Rezultāti.....	24
2.1. Rutīnas histoloģijas atrade.....	24
2.2. Imūnhistoķīmisko marķieru raksturojums kontroles un pacientu grupās.....	26
2.2.1. Matrices metaloproteināzes un matrices metaloproteināžu audu inhibitori.....	26
2.2.2. Proliferācijas marķieris Ki-67.....	32
2.2.3. Nukleārais faktors kapa beta.....	34
2.2.4. Iekaisumu veicinošie un nomācošie citokīni.....	36
2.2.5. Cilvēka beta defensīni.....	39
2.2.6. Vaskulārais endoteliālais augšanas faktors.....	42
2.2.7. <i>Sonic hedgehog</i> gēna proteīns.....	44
2.3. Datu statistiskās korelācijas.....	46
2.3.1. Datu statistiskās korelācijas kontroles grupā.....	46
2.3.2. Datu statistiskās korelācijas bērnu pacientu grupā.....	47
2.3.3. Datu statistiskās korelācijas pieaugušo pacientu grupā.....	49
3. Diskusija.....	50
3.1. Audu remodelācija.....	51

3.2. Holestatomas audu proliferācija .....	55
3.3. Transkripcijas faktors .....	56
3.4. Iekaisumu veicinošie un nomācošie citokīni .....	58
3.5. Cilvēka beta defensīni .....	60
3.6. Vaskulārais endoteliālais augšanas faktors.....	63
3.7. <i>Sonic hedgehog</i> gēna proteīns .....	64
Secinājumi .....	68
Priekšlikumi .....	70
Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu.....	71
Literatūras un avotu saraksts .....	71
Pateicības .....	81

## Darbā izmantotie saīsinājumi

AAI	Anatomijas un antropoloģijas institūts
BKUS	Bērnu klīniskā universitātes slimnīca
ECM	ekstracelulārā matrice
HβD-2	cilvēka beta defensīns 2
HβD-4	cilvēka beta defensīns 4
IL-1α	interleikīns 1 alfa
IL-10	interleikīns 10
Ki-67	proliferācijas marķieris <i>Kiel 67</i>
MMPs	matrices metaloproteināzes
MMP-2	matrices metaloproteināze 2
MMP-9	matrices metaloproteināze 9
NF-κβ	nukleārais faktors kapa beta
PĶR	polimerāzes ķēdes reakcija
PSKUS	Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca
RSU	Rīgas Stradiņa universitāte
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
TIMPs	matrices metaloproteināzes audu inhibitori
TIMP-2	matrices metaloproteināzes audu inhibitors 2
TIMP-4	matrices metaloproteināzes audu inhibitors 4
VEGF	vaskulārais endoteliālais augšanas faktors
VSIA	valsts sabiedrība ar ierobežotu atbildību

## Ievads

Iegūta holesteatoma ir labdabīgs, bet lokāli agresīvs veidojums vidusausī. Tas sastāv no hiperproliferatīvām keratinizēta plakanā epitēlija šūnām (Bhutta et al., 2011). Lai arī veidojums ir rets, ar vidējo incidenci Eiropā 7 uz 100 000 cilvēku gadā, tomēr tās pilnīga izārstēšana ir sarežģīta un nereti ir sagaidāms holesteatomas recidīvs (Britze et al., 2017). Biežākās sūdzības ir konduktīvs vai jaukts (konduktīvs un sensoneirāls) dzirdes zudums, strutaini izdalījumi no auss, retāk arī auss sāpes. Holesteatoma var radīt potenciāli dzīvībai bīstamas un dzīves kvalitāti ietekmējošas komplikācijas, kā meningīts, smadzeņu abscess, sejas nerva paralīze un S veida sinusa tromboze (Kuo et al., 2015). Iegūtu holesteatomu raksturo hronisks iekaisums, ātra augšana un apkārtējo audu destrukcija, tādēļ mūsu darbā tika izvēlēti šos procesus raksturojoši audu faktori: matricēs metaloproteināzes 2 un 9, matricēs metaloproteināzes audu inhibitori 2 un 4, proliferācijas marķieris Ki-67, nukleārais faktors kapa beta, interleikīni 1 un 10, cilvēka beta defensīni 2 un 4, vaskulārais endoteliālais augšanas faktors un *Sonic hedgehog* gēna proteīns.

Biežāk pētītie audu faktori holesteatomas gadījumā ir matricēs metaloproteināzes (MMPs), jo ir atrasta saistība starp MMP-2 un MMP-9 un kaula destrukciju vidusausī (Morales et al., 2007; Juhász et al., 2009).

Savukārt matricēs metaloproteināzes audu inhibitori 2 (TIMP-2) un matricēs metaloproteināzes audu inhibitori 4 (TIMP-4) ierobežo MMP-2 un MMP-9 darbību (Givvimani et al., 2010). Izpētīts, ka nevienmērīga MMPs un TIMPs darbība var radīt audu degradāciju holesteatomas gadījumā (Schönermark et al., 1996; Suchozebrska-Jesionek et al., 2008). Tomēr līdz šim nav analizēta TIMP-4 ietekme holesteatomas audos.

Viena no holesteatomas audu raksturīgākajām pazīmēm ir to ātrā augšana un nepārtrauktā šūnu proliferācija (Yešilova et al., 2017). Ki-67 ir visbiežāk lietotais proliferācijas marķieris pētījumos ar holesteatomu.

Nukleārais faktors kapa beta (NF- $\kappa$ B) cilvēka organismā piedalās daudzos procesos, galvenokārt regulējot gēnus, kuri saistīti ar iekaisumu, šūnu proliferāciju un apoptozi (Giuliani et al., 2018). Holesteatomas patoģenēzē NF- $\kappa$ B regulē šūnu proliferāciju un iekaisuma procesus (Schürmann et al., 2022; Byun et al., 2010). Tomēr pētījumos trūkst kompleksa skatījuma uz NF- $\kappa$ B ietekmi uz dažādiem šīs patoloģijas procesiem.

Holesteatomu raksturo konstants hronisks iekaisums, kā arī pacientiem veidojas recidivējoši strutaini iekaisumi vidusausī (Schürmann et al., 2022). Interleikīns 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) ir spēcīgs iekaisumu veicinošs citokīns, kas ir saistīts ar holesteatomas agresivitāti (Bujía et al., 1996). Interleikīns 10 (IL-10) ir viens no aktīvākajiem iekaisumu nomācošiem citokīniem (Mosser and Zhang, 2008). Uzskata, ka regulācijas traucējumi starp iekaisumu veicinošiem un nomācošiem citokīniem varētu izskaidrot holesteatomas vietējo agresivitāti (Kuczkowski et al., 2011). Cilvēka beta defēnsīns 2 un 4 (H $\beta$ D-2; H $\beta$ D-4) ir vietējas nozīmes antimikrobiāli peptīdi, kas ir efektīvi cīņā ar baktērijām, kuras rada iekaisumu holesteatomas gadījumā (Harder et al., 1997; García et al., 2001). Tomēr ir maz informācijas par defēnsīnu aktivitāti holesteatomas audos, kā arī to mijiedarbību ar citokīniem. Šajā pētījumā pirmo reizi tika pētīts H $\beta$ D-4 holesteatomas audos.

Holesteatomas palielināšanās izmēros ir saistīta ar pastiprināto angiogēnēzes procesu, un kā viens no aktīvākajiem angiogēnēzi veicinošiem faktoriem ir vaskulārais endoteliālais augšanas faktors (VEGF) (Fukudome et al., 2013). Tomēr vēl joprojām VEGF ietekme uz holesteatomas audiem ir maz pētīta un neskaidra.

Mūsdienās aktuāli ir gēnu pētījumi, šajā pētījumā tika apskatīta *Sonic hedgehog* (SHH) gēna proteīna saistība ar holesteatomas audiem otoģenētiskā aspektā. Lai arī šis ir viens no pirmajiem pētījumiem par SHH holesteatomas audos un informācijas ir maz, tomēr zināms, ka SHH gēna

darbības traucējumi var radīt ārējās, iekšējās un vidusauss patoloģijas (Chiang et al., 1996).

Jāatzīmē, ka līdz šim pētījumi galvenokārt ir veikti vienā vecumgrupā, kura salīdzināta ar kontroles grupas audiem, kā arī pētījumi skāruši konkrētu procesu. Šis ir viens no nedaudziem pētījumiem, kur salīdzināta bērnu un pieaugušo populācija, kā arī tās salīdzinātas ar kontroles grupu un vienkopus apskatīti vairāki audu faktori, kas mērķēti raksturo dažādus patofizioloģiskus procesus holestatomas audos, un šāda pieeja dod pilnīgāku ieskatu slimības attīstībā.

## **Darba mērķis**

Komplekss holestatomas audu remodelācijas, proliferācijas, iekaisuma, vietējās aizsardzības, angioģenēzes, kā arī gēnu proteīna relatīvā daudzuma un izplatības raksturojums ontogēnētiskajā aspektā.

## **Darba uzdevumi**

Promocijas darba mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Noteikt audu remodelācijas marķieru (MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-4) ekspresiju dažāda vecuma pacientu holestatomas audos.
2. Noteikt šūnu proliferācijas marķiera (Ki-67) ekspresiju dažāda vecuma pacientu holestatomas audos.
3. Noteikt transkripcijas faktora NF- $\kappa$ B ekspresiju dažāda vecuma pacientu holestatomas audos.
4. Noteikt ar iekaisuma regulāciju saistīto citokīnu (IL-1 $\alpha$ , IL-10) ekspresiju dažāda vecuma pacientu holestatomas audos.
5. Noteikt audu vietējās aizsardzības marķieru (H $\beta$ D-2 un H $\beta$ D-4) ekspresiju dažāda vecuma pacientu holestatomas audos.
6. Noteikt angioģenēzi ietekmējošo (VEGF) faktoru ekspresiju dažāda vecuma pacientu holestatomas audos.



7. Noteikt *Sonic hedgehog* (SHH) gēna proteīna ekspresiju dažāda vecuma pacientu holestēatomas audos.
8. Noteikt iepriekš minētos marķierus kontroles grupas pacientu materiālā.
9. Veikt datu statistisko apstrādi, salīdzināt pētāmās grupas un noteikt audu faktoru iespējamo savstarpējo korelāciju dažāda vecuma pacientu holestēatomas audos un kontroles grupas pacientu materiālā.

## Darba hipotēze

Pastāv atšķirības bērnu un pieaugušo holestēatomas remodelācijas, proliferācijas, iekaisuma, vietējās aizsardzības, angiogēnēzes faktoru un *Sonic hedgehog* gēna proteīna ekspresijā.

## Darba novitāte

Līdz šim pacientiem ar holestēatomu sporādiski un nesaistīti tika pētītas tādas selektīvas audu pārmaiņas kā remodelācija, proliferācija, iekaisums, vietējā audu aizsardzība. Šajā pētījumā šīs audu pārmaiņas tiek pētītas **kompleksi**. Pētījumā tiek izmantoti divpadsmit dažādi audu faktori, kas, pēc mums pieejamās informācijas, ir **lielākais audu faktoru daudzums**, kurš tiek izmantots **bērnu un pieaugušo** holestēatomas izpētē viena pētījuma ietvaros. Šajā pētījumā izmantoti tādi holestēatomas gadījumā iepriekš nepētīti audu faktori kā TIMP-4, H $\beta$ D-4 un SHH. Kombinējot šos dažādos audu faktoros, analizējot korelācijas starp tiem, tiek iegūts daudz plašāks ieskats par holestēatomas audu kopīgajām un atšķirīgajām morfoloģiskajām norisēm bērniem un pieaugušajiem, kā trūkst pētījumos, kuros šīs audu pārmaiņas pētītas atsevišķi un iepriekš.

# 1. Materiāls un metodes

## 1.1. Pētāmais materiāls un pacientu iedalījums grupās

Lai realizētu pētījumu, tika izveidotas trīs grupas: kontroles grupa, bērnu pacientu grupa un pieaugušo pacientu grupa.

### 1.1.1. Kontroles grupa

Kontroles grupas audi tika iegūti no Rīgas Stradiņa universitātes (RSU) Anatomijas un antropoloģijas institūta (AAI) vēsturiskās kolekcijas. Kontroles grupu veidoja ārējās auss ejas āda, kas tika iegūta no septiņu mirušu cilvēku ķermeņiem.

Kontroles audu izvēli ietekmēja ētiskie apsvērumi, kas neļāva veikt biopsiju no veselu pacientu ārējās auss ejas ādas, jo tas pacientiem varētu radīt komplikāciju risku dzīšanas periodā.

Ārējās auss ejas audi tika nogādāti RSU AAI Morfoloģijas laboratorijā, kur tika veikta rutīnas histoloģiskā izmeklēšana. Pēc audu primāras izmeklēšanas septiņu pacientu audi tika iekļauti pētījumā un trīs pacienti no pētījuma tika izslēgti. Iekļaušanas kritēriji: pacienti bez zināmas ādas sasilšanas; pacienti bez zināma hroniska vidusauss iekaisuma. Izslēgšanas kritēriji: nepietiekams ārējās auss ejas audu materiāls (pēc rutīnas histoloģiskās izmeklēšanas trūkst epidermas vai dermas slāņa), iekaisuma pazīmes.

Kontroles audu izmantošanai pētījumā saņemta atļauja no RSU Ētikas komitejas (Nr. 2-PĒK-4/475/2022; 29.10.2022.).

### Kontroles grupas pacientu raksturojums

Kontroles grupas veidošanai tika izmantots septiņu mirušu cilvēku ķermeņu materiāls – ārējā auss ejas āda. Grupā bija trīs sievietes un četri vīrieši vecumā no 35 līdz 50 gadiem, ar maņu orgānu un ādu nesaistītām patoloģijām.

Kontroles grupa salīdzināšanai derīga gan bērnu, gan pieaugušo grupām, jo bērna āda pēc sešu gadu vecuma līdzinās pieaugušo ādai (Stamatas et al., 2023).

Tādēļ no mirušu cilvēku ķermeņiem iegūtā āda ir atbilstoša izmantošanai kā kontroles grupa.

### **1.1.2. Bērnu pacientu grupa**

Materiāls bērnu pacientu grupai tika iegūts VSIA “Bērnu klīniskā universitātes slimnīca” (BKUS) laika posmā no 2019. gada novembra līdz 2023. gada jūnijam. Pētāmie audi tika iegūti no pacientiem auss holesteatomu operāciju laikā. Tika iegūti paraugi no 37 unikāliem pacientiem vecumposmā no 5 līdz 17 gadiem. Morfoloģiski tika apstiprināta holesteatoma.

Audus tālāk nogādāja RSU AAI Morfoloģijas laboratorijā, kur tika veikta rutīnas histoloģiskā izvērtēšana. Pēc audu primārās izvērtēšanas 25 (15 zēni; 10 meitenes) pacientu audi tika novērtēti kā atbilstoši pētījumam.

Iekļaušanas kritēriji: bērna vecums (0–18 gadi); iegūta holesteatoma. Izslēgšanas kritēriji: nepietiekams holesteatomas audu materiāls, kas nav piemērots imūnhistoķīmiskai apstrādei (rutīnas histoloģiskajā atradē trūkst holesteatomas matricas vai perimatrixa).

Holesteatomas audu materiāla iegūšanas laikā netika radīts kaitējums pacientu veselībai, jo veikta operācija holesteatomas ekscīzijai. Pētījums tika veikts saskaņā ar 2013. gada Helsinku deklarāciju. Pētījums apstiprināts RSU Ētikas komitejā (Nr. 6-2/7/4; 05.09.2019.). Tika saņemta atļauja no BKUS Izglītības un zinātnes departamenta. Pētījuma būtība tika izstāstīta pacientiem un pacienta vecākiem, iegūta rakstiska piekrišana no pacienta vecākiem par piedalīšanos pētījumā.

Bērnu grupa tika definēta pēc Latvijas likumdošanas “Bērnu tiesību aizsardzības likuma” 3. panta 1. daļas: *“Bērns ir persona, kas nav sasniegusi 18 gadu vecumu, izņemot tās personas, kuras saskaņā ar likumu izsludinātas par pilngadīgām vai stājušās laulībā pirms 18 gadu vecuma sasniegšanas.”*

Bērnu grupas pacientu raksturojums apskatāms 1.1. tabulā.

## Bērnu grupas pacientu raksturojums

Nr.	Šifrs	Dzimums	Vecums (gadi)	Diagnoze; ārstēšana
1.	BH 24	Meitene	5	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika
2.	BH 25	Zēns	5	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika
3.	BH 23	Zēns	6	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika
4.	BH 19	Zēns	6	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika
5.	BH 21	Meitene	8	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika
6.	BH 3	Meitene	9	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika
7.	BH 6	Zēns	10	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika
8.	BH 1	Zēns	11	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
9.	BH 11	Meitene	12	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika
10.	BH 10	Zēns	13	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
11.	BH 32	Meitene	13	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika
12.	BH 30	Zēns	14	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika
13.	BH 34	Zēns	14	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika

1.1. tabulas turpinājums

Nr.	Šifrs	Dzimums	Vecums (gadi)	Diagnoze; ārstēšana
14.	BH 12	Meitene	15	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika
15.	BH 14	Meitene	15	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika
16.	BH 18	Zēns	15	Abpusējs hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika kreisajā pusē
17.	BH 27	Zēns	15	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
18.	BH 2	Zēns	16	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika
19.	BH 7	Meitene	16	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika
20.	BH 8	Meitene	16	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
21.	BH 20	Meitene	16	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
22.	BH 5	Zēns	17	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
23.	BH 29	Zēns	17	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika
24.	BH 35	Zēns	17	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; <i>Canal wall-up</i> operācija, timpanoplastika
25.	BH 37	Zēns	17	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika

### 1.1.3. Pieaugušo pacientu grupa

Materiāls pieaugušo pacientu grupai tika iegūts VSIA “Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca” (PSKUS) laika posmā no 2019. gada novembra līdz 2023. gada jūnijam. Pētāmie audi tika iegūti no pacientiem auss holesteatomu operāciju laikā. Iegūti paraugi no 35 unikāliem pacientiem vecumposmā no 19 līdz 75 gadiem. Morfoloģiski tika apstiprināta holesteatoma. Audus tālāk nogādāja RSU AAI Morfoloģijas laboratorijā, kur tika veikta rutīnas histoloģiskā izvērtēšana. Pēc ausu primārās izvērtēšanas 25 (11 vīrieši; 14 sievietes) pacientu audi tika novērtēti kā atbilstoši pētījumam.

Iekļaušanas kritēriji: pieaugušā vecums (> 18 gadiem); iegūta holesteatoma. Izslēgšanas kritēriji: nepietiekams holesteatomas ausu materiāls, kas nav piemērots imūnhistoķīmiskai apstrādei (rutīnas histoloģiskajā atradē trūkst holesteatomas matrkixa vai perimatrkixa).

Holesteatomas ausu materiāla iegūšanas laikā netika radīts kaitējums pacientu veselībai. Pētījums tika veikts saskaņā ar 2013. gada Helsinku deklarāciju. Pētījums apstiprināts RSU Ētikas komitejā (Nr. 6-2/7/4; 05.09.2019.). Tika saņemta atļauja no PSKUS Izglītības un zinātnes departamenta. Pētījuma būtība izstāstīta pacientiem, iegūta rakstiska piekrišana no pacienta par piedalīšanos pētījumā. Lai nodrošinātu pacientu datu aizsardzību, pacienti tika šifrēti.

Pieaugušo grupas pacientu raksturojums apskatāms 1.2. tabulā.

1.2. tabula

#### Pieaugušo grupas pacientu raksturojums

Nr.	Šifrs	Dzimums	Vecums (gadi)	Diagnoze; ārstēšana
1.	PH 16	Vīrietis	19	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
2.	PH 15	Sieviete	22	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika

## 1.2. tabulas turpinājums

Nr.	Šifrs	Dzimums	Vecums (gadi)	Diagnoze; ārstēšana
3.	PH 3	Vīrietis	23	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
4.	PH 18	Sieviete	24	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
5.	PH 12	Vīrietis	26	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
6.	PH 30	Vīrietis	26	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
7.	PH 23	Sieviete	27	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
8.	PH 6	Sieviete	28	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
9.	PH 7	Sieviete	31	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu, pārējoša <i>n. facialis dxt</i> parēze; radikāla vidusauss, timpanoplastika
10.	PH 25	Sieviete	32	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
11.	PH 35	Sieviete	34	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
12.	PH 4	Vīrietis	38	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
13.	PH 8	Vīrietis	38	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
14.	PH 13	Vīrietis	39	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
15.	PH 20	Vīrietis	39	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika

1.2. tabulas turpinājums

<b>Nr.</b>	<b>Šifrs</b>	<b>Dzimums</b>	<b>Vecums (gadi)</b>	<b>Diagnoze; ārstēšana</b>
16.	PH 22	Sieviete	40	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
17.	PH 24	Sieviete	41	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
18.	PH 28	Vīrietis	41	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
19.	PH 17	Sieviete	45	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
20.	PH 2	Vīrietis	46	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
21.	PH 31	Vīrietis	50	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
22.	PH 1	Sieviete	58	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
23.	PH 33	Sieviete	70	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
24.	PH 29	Sieviete	74	Kreisās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika
25.	PH 5	Sieviete	75	Labās puses hronisks vidusauss iekaisums ar holesteatomu; radikāla vidusauss operācija, timpanoplastika



## **1.2. Izmeklēšanas metodes**

### **1.2.1. Audu iegūšana un sagatavošana krāsošanai**

#### **Kontroles audu ieguve**

Kontroles audi, ārējās auss ejas āda, tika iegūti no mirušu cilvēku audiem. Ar mazajām lodziņstangām tika veikta audu nekropsija no dziļākā ārējās auss ejas rajona. Tika iegūti apmēram  $3 \times 3$  mm lieli audu paraugi, kas ievietoti *Stefanini* šķīdumā un nogādāti RSU AAI Morfoloģijas laboratorijā.

#### **Bērnu un pieaugušo holersteatomas audu ieguve**

Bērnu un pieaugušo holersteatomas audus ieguva holersteatomas operāciju laikā BKUS un PSKUS. Operācijas laikā evakuētos holersteatomas audus (pēc iespējas lielāku audu materiālu vai vismaz 5 mm diametrā) nekavējoties ievietoja *Stefanini* šķīdumā. Operāciju laikā pacientiem netika veiktas nekādas papildu manipulācijas. Netika nodarīts arī nekāds papildu kaitējums pacientiem, kuri piedalījās pētījumā, – visiem pacientiem veikta tāda paša apjoma operācija, kā jebkuras holersteatomas operācijas gadījumā.

#### **Audu fiksācija un sagatavošana krāsošanai**

Biopsijā iegūtos audus nekavējoties fiksēja *Stefanini* šķīdumā (Stefanini et al., 1967). Fiksējošo šķīdumu pagatavo no 20 g paraformaldehīda, 150 ml pikrīnskābes, 425 ml Sorensena fosfātu bufera (pH 7,2) un 425 ml destilēta ūdens. Paraformaldehīds tika izšķīdināts destilētā ūdenī, tam pievienoja buferšķīdumu un pikrīnskābi. Šo šķīdumu iepildīja Ependorfa tipa mēģenēs, kurās ievietoja biopsijas audu materiālu. Biopsijas materiāls tika glabāts ledusskapī (+4 °C), līdz nogādāts RSU AAI Morfoloģijas laboratorijā, kur tika veikta tālāka audu apstrāde.

Pēc nogādāšanas RSU Morfoloģijas laboratorijā audu materiāls 24 h tika skalots ar *Tyrod's* šķīdumu (136,9 mM NaCl, 2,68 nM KCl, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>

2H<sub>2</sub>O, 1,05 mmol/l MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 11,9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,42 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 5,5 mM glikoze destilētā ūdenī). Fiksētais materiāls tika dehidrēts, lietojot spirta šķīdumus pēc attiecīgas shēmas: 70° spirta šķīdums 30 minūtes, 80° spirta šķīdums 1–2 stundas, 96° spirta šķīdums 3–4 stundas, 96° spirta šķīdums 24 stundas. Audu paraugu attaukošana tika veikta 30 minūtes ksilolā I un 30 min. ksilolā II, tad noturēja vienu stundu parafīnā I un divas stundas parafīnā II. Pēc tam tos ieguldīja izkausētā parafīnā, izveidojot parafīna blokus. No parafīna blokiem ar pusautomātisko rotācijas mikrotomu (*Leica RM2245, Leica Biosystems Richmond Inc., Amerikas Savienotās Valstis*) izgatavoja 3–4 μm plānus audu griezumus un novietoja uz priekšmetstikliņiem (*HistoBond®+, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Vācija*). Pēc tam priekšmetstikliņus ievietoja žāvēšanai termostatā 56 °C 20–60 minūtes. Tālākā apstrāde tika veikta atbilstoši rutīnas histoloģiskās krāsošanas vai imūnhistoķīmijas metodei.

### 1.2.2. Rutīnas histoloģijas krāsošanas metode

Rutīnas audu histoloģiskā krāsošana notika ar hematoksilīnu un eozīnu. Termostatā izžāvētie audu griezumi tika deparafinizēti ksilolā I (5 minūtes) un ksilolā II (5 minūtes). Tālāk veica audu rehidratāciju ar dažādas koncentrācijas spirtiem pēc shēmas: 96° spirta šķīdums 3 minūtes; 96° spirta šķīdums 3 minūtes; 70° spirta šķīdums 3 minūtes. Tālāk audu griezumi tika krāsoti ar hematoksilīnu (kods 05-M06002, *Mayer's Hematoxylin, Bio Optica Milano S.p.A., Itālija*) un eozīnu (kods 05-B10003, *Eosin Y alcoholic solution, Bio Optica Milano S.p.A., Itālija*). Pēc krāsošanas sekoja skalošana ar tekošu ūdeni, dehidratācija ar dažādas koncentrācijas spirtiem: 70° spirta šķīdums 3 minūtes; 96° spirta šķīdums 3 minūtes; 96° spirta šķīdums 3 minūtes. Un dzidrināšana ar karboksilolu un ksilolu. Preparātu sagatave tika pabeigta, uzpilnot histoloģisko līmi (kods 6900002, *Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Vācija*) un paraugus pārklājot ar segstikliņiem (*Carl Roth GmbH + Co, Vācija*). Mikropreparātos acidofilās

struktūras krāsojās sārtā, bet bazofilās – zili violetā tonī (Lillie et al., 1976; Fischer et al., 2008).

Mikropreparāti tika analizēti ar gaismas mikroskopu (*Leica DM500RB*, *Leica Biosystems Richmond Inc.*, Amerikas Savienotās Valstis) un mikrofotogrāfijas fiksētas ar digitālo kameru (*Leica DC 300F*, *Leica Microsystem AG*, Vācija).

### **1.2.3. Imūnhistoķīmiskā (biotīna-streptavidīna) izmeklēšanas metode un reaģenti**

Audu griezumus krāsoja pēc biotīna-streptavidīna metodes (Ozola and Pilmane, 2023). Audu paraugu fiksācija, materiāla sagatavošana ieguldīšanai parafīna blokos un griezumu sagatavošana uz priekšmetstikliņiem tika veikta pēc iepriekšējā nodaļā aprakstītās shēmas (skat. 1.2.2. nodaļu). Termostatā izžāvētie audu griezumi tika deparafinizēti ksilolā I (5 minūtes) un ksilolā II (5 minūtes). Tad tika veikta audu dehidratācija ar dažādas koncentrācijas spirtiem pēc shēmas: 96° spirta šķīdums 3 minūtes; 96° spirta šķīdums 3 minūtes; 70° spirta šķīdums 3 minūtes. Deparafinizētie audi tika ielikti turētājā un divas reizes pa 5 minūtēm skaloti ar TRIS bufera šķīdumu (kods 2022X02692, *Diapath S.p.A.*, Itālija), tad vārīti EDTA bufera šķīdumā (kods 2020X19334, *Diapath S.p.A.*, Itālija) mikroviļņu krāsnī 20 minūtes. Tos atdzesēja līdz 65 °C un divas reizes pa 5 minūtēm mazgāja TRIS bufera šķīdumā, un ar 3 % peroksīda šķīdumu (kods 925B-02, *Cell Marque<sup>TM</sup>*, Amerikas Savienotās Valstis) 10 minūtes tika bloķēta endogēnās peroksidāzes aktivitāte. Tālāk tika veikta skalošana ar TRIS bufera šķīdumu divas reizes pa 5 minūtēm. Fona krāsojuma mazināšanai tika lietots bloķējošais serums 20 minūtes. Visi analizējamie audu paraugi vienu stundu tika apstrādāti ar primāro antivielu (informācija par antivielām redzama 1.3. tabulā). Visas pētījumā lietotās antivielas tika atšķaidītas ar *Antibody Diluent* (kods 938B-05, *Cell Marque<sup>TM</sup>*, Amerikas Savienotās Valstis).

Antivielām (iegūtas no peles vai truša) tika lietota *HiDef Detection<sup>TM</sup> HRP Polymer* (kods 954D-30, *Cell Marque<sup>TM</sup>*, Amerikas Savienotās Valstis) krāsošanas sistēma. Pēc primārās antivielas inkubācijas un audu paraugu skalošanas TRIS buferī (trīs reizes pa 5 minūtēm) tika izmantots *HiDef Detection<sup>TM</sup>* reakcijas amplifikators (kods 954D-31, *Cell Marque<sup>TM</sup>*, Amerikas Savienotās Valstis) istabas temperatūrā 10 minūtes. Tad preparātus skaloja ar TRIS bufera šķīdumu (trīs reizes pa 5 minūtēm), pēc kā tika pievienots *HiDef Detection<sup>TM</sup> HRP* polimēra iezīmētājs (kods 954D-32, *Cell Marque<sup>TM</sup>*, Amerikas Savienotās Valstis) un veikta inkubācija istabas temperatūrā 10 minūtes. Pēc inkubācijas paraugi tika atkārtoti skaloti ar TRIS bufera šķīdumu (trīs reizes pa 5 minūtēm). Pēc tam audus apstrādāja ar *DAB* substrāta hromogēno sistēmu (kods 957D-30, *Cell Marque<sup>TM</sup>*, Amerikas Savienotās Valstis) un veica audu inkubāciju istabas temperatūrā līdz 10 minūtēm, lai panāktu pozitīvo struktūru krāsojumu brūnā krāsā. Tālāk veica paraugu skalošanu tekošā ūdenī un krāsošanu ar hematoksilīnu (kods 05-M06002, *Mayer's Hematoxylin*, *Bio Optica Milano S.p.A.*, Itālija) 2 minūtes. Noslēgumā preparāti tika atūdeņoti ar pieaugošas koncentrācijas (70–96°) spirtu un dzidrināti ar karboksilolu un ksilolu. Pēc tam tika uzpilināta histoloģiskā līme *Pertex<sup>®</sup>* (kods 00801-EX, *HistoLab*, Zviedrija) un paraugi pārklāti ar segstikliņiem.

Mikropreparāti tika analizēti ar gaismas mikroskopu (*Leica DM500RB*, *Leica Biosystems Richmond Inc.*, Amerikas Savienotās Valstis) un mikrofotogrāfijas tika fiksētas ar digitālo kameru (*Leica DC 300F*, *Leica Microsystem AG*, Vācija).

Pozitīvā kontrole tika veikta antivielu ražotājfirmu norādītajos audos, kuros vienmēr novērojama pozitīva reakcija. Negatīvā kontrole tika panākta, izslēdzot primāro antivielu un to aizstājot ar *Antibody Diluent* antivielu atšķaidītāju.

## Pētījumā izmantotās antivielas

Nr.	Antiviela	Kods	Izcelsme	Darba atšķaidījums	Ražotājs
1.	MMP-2	sc-53630	Pele, monoklonāla	1:100	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, ASV</i>
2.	MMP-9	sc-10737	Trusis, poliklonāls	1:100	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, ASV</i>
3.	TIMP-2	sc-21735	Pele, monoklonāla	1:100	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, ASV</i>
4.	TIMP-4	sc-30076	Trusis, poliklonāls	1:100	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, ASV</i>
5.	Ki-67	1325506A	Trusis, poliklonāls	1:100	<i>Cell Marque, Rocklin, CA, ASV</i>
6.	NF-κβ	Sc-109	Trusis, poliklonāls	1:200	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, ASV</i>
7.	IL-1α	sc-9983	Pele, monoklonāla	1:50	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, ASV</i>
8.	IL-10	ab34843	Trusis, poliklonāls	1:400	<i>Abcam, Cambridge, Lielbritānija</i>
9.	HβD-2	sc-20798	Trusis, poliklonāls	1:200	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, ASV</i>
10.	HβD-4	sc-59496	Pele, monoklonāla	1:50	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, ASV</i>
11.	VEGF	orb191500	Trusis, poliklonāls	1:100	<i>Biorbyt Ltd., Lielbritānija</i>
12.	SHH	LS-C49806	Trusis, poliklonāls	1:100	<i>LifeSpan BioSciences, Inc., Seattle, WA, ASV</i>

Saīsinājumi: MMP-2 – matricē metaloproteināze 2; MMP-9 – matricē metaloproteināze 9; TIMP-2 – matricē metaloproteināzes audu inhibitori 2; TIMP-4 – matricē metaloproteināzes audu inhibitori 4; Ki-67 – *Kiel-67*; NF-κβ – nukleārais faktors kapa beta; IL-1α – interleikīns 1 alfa; IL-10 – interleikīns 10; HβD-2 – cilvēka beta defensīns 2; HβD-4 – cilvēka beta defensīns 4; VEGF – vaskulārais endoteliālais augšanas faktors; SHH – *Sonic hedgehog* gēna proteīns.

### 1.3. Datu uzskaites un apstrādes metodes

#### 1.3.1. Datu vizuālais izvērtējums

Imūnhistoķīmiskajā audu analīzē, lai izvērtētu faktorpozitīvo šūnu relatīvo daudzumu, tika izmantota puskvantitatīvā skaitīšanas metode (Pilmane et al., 2021). Pozitīvo struktūru relatīvais biežums tika noteikts piecos nejaušos redzes laukos un kā galējais rezultāts izmantots vidējais biežums no šiem redzes laukiem. Mikropreparātu izvērtēšanu veica divi neatkarīgi morfoloģi. Puskvantitatīvās skaitīšanas metodes apzīmējumi un skaidrojumi atrodami 1.4. tabulā.

1.4. tabula

#### Imūnhistoķīmiski faktorpozitīvo struktūru uzskaitīšanas kritēriji

Apzīmējums	Pārveide skaitļos – statistiskai analīzei	Skaidrojums
0	0	Redzes laukā nav atrodama neviena pozitīva struktūra
0/+	0,5	Redzes laukā retas pozitīvas struktūras
+	1	Redzes laukā maz pozitīvu struktūru
+/++	1,5	Redzes laukā maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru
++	2	Redzes laukā vidēji daudz pozitīvu struktūru
++/+++	2,5	Redzes laukā vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru
+++	3	Redzes laukā daudz pozitīvu struktūru
+++/++++	3,5	Redzes laukā daudz līdz ļoti daudz pozitīvas struktūras
++++	4	Redzes laukā ļoti daudz pozitīvas struktūras

#### 1.3.2. Datu statistiskās apstrādes metodes

Pētījuma dati tika analizēti, izmantojot aprakstošās statistikas metodes (Teibe, 2007). Tā kā faktoru novērtējums ir ordinālas mērskalas dati un neatbilst normālsadalījumam (pēc *Shapiro-Wilk* testa un histogrammu vizuālā novērtējuma), aprēķinos tika izmantoti neparametriskie testi.

Statistiskās atšķirības starp pētāmajām grupām (bērnu, pieaugušo un kontroles) tika noteiktas ar *Kruskal-Wallis* testu (Barton and Peat, 2014), kas tika izvēlēts, jo ietver *Bonferroni* korekciju, kas neļauj pārsniegt alfa kļūdu – 5 %, ja aprēķinos tiek izmantotas trīs un vairāk salīdzināmās grupas.

Lai izvērtētu divu dažādu faktoru savstarpējās korelācijas vienas grupas ietvaros, tika lietots *Spearman* rangu korelācijas koeficients (Forthofer et al., 2007). Aprēķināto korelāciju interpretācija aplūkojama 1.5. tabulā.

Rezultāti tika uzskatīti par statistiski nozīmīgiem, ja  $p$  vērtība bija  $< 0,05$ . Datu statistiskā analīze tika veikta ar statistikas programmatūras IBM SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) 25.0 versijas palīdzību (*IBM Company*, Chicago, Illinois, Amerikas Savienotās Valstis).

1.5. tabula

### ***Spearman* ranga korelāciju skaidrojums**

<b><i>r<sub>s</sub></i> (<i>Spearman's rho</i>)</b>	<b>Skaidrojums</b>
0,0–0,2	ļoti vāja korelācija
0,2–0,4	vāja korelācija
0,4–0,6	vidēji cieša korelācija
0,6–0,8	cieša korelācija
0,8–1,0	ļoti cieša korelācija

## 2. Rezultāti

### 2.1. Rutīnas histoloģijas atrade

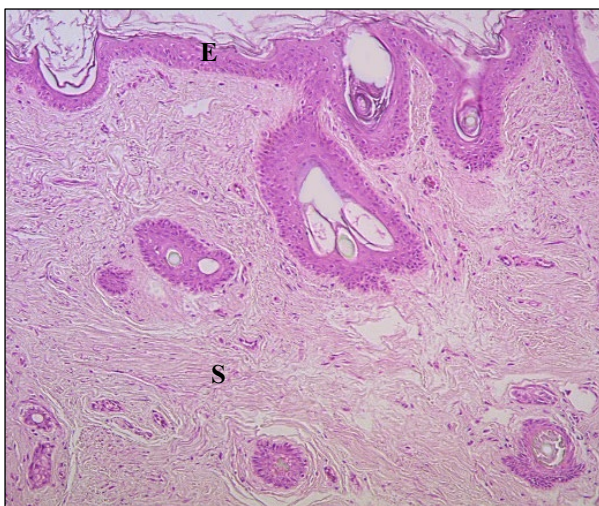
**Kontroles grupas audi** – ārējās auss ejas āda no septiņiem mirušiem cilvēkiem – uzrādīja neizmainītu un bez iekaisuma infiltrācijas esošu epidermu un tādus pašus subepitēlija saistaudus.

Epitēlijs bija daudzkārtains, plakans pārragots, tam izšķīra piecus slāņus – bazālo, dzeloņaino, graudaino, spīdošo un raga slāni. Visi slāņi bija atbilstoši vispārpieņemtajai normai.

Dermā jeb saistaudu slānī, kārpīņu slānī bija vērojami kapilāri, irdenie nenoformētie saistaudi un šūnas (fibroblasti, makrofāgi, ekstravaskulāri leukocīti), bet tīklainajā slānī šūnu un asinsvadu bija mazāk un saistaudi bija blīvāki (sk. 2.1. attēlu).

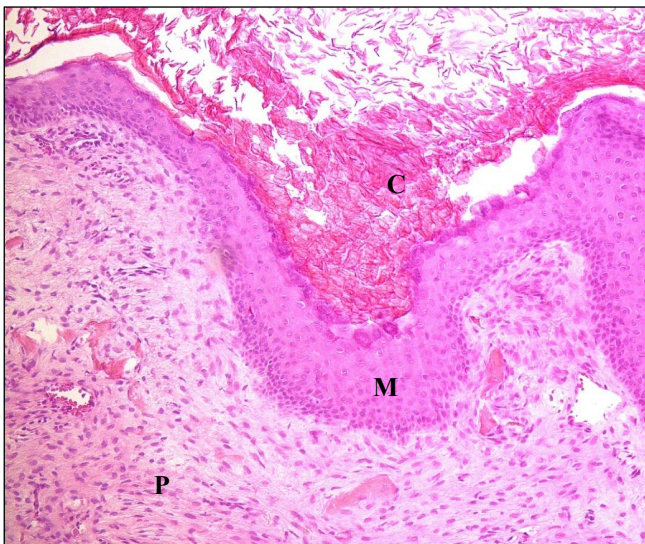
Būtiskas atšķirības starp **bērnu un pieaugušo holestatomas** audu materiāliem rutīnas histoloģijas izmeklējumos netika novērotas. Visiem pētījumā iekļautajiem holestatomas audu paraugiem bija izšķirami visi trīs slāņi: (1) Cistiskais slānis bija apjomīga bezkodolu keratinocītu masa, ko parasti var pielīdzināt neizmainītas ādas raga slānim. Holestatomas gadījumā šis slānis ir izteiktāks. (2) Matrikss – daudzkārtains, plakans pārragots epitēlijs, iespējams izšķirt tos pašus slāņus, kā neizmainītas ādas epitēlijam kontroles grupā, – atšķirība ir tā, ka holestatomas gadījumā šie epitēlija slāņi ir hiperplazēti. (3) Perimatrikss – subepitēlija saistaudi jeb granulācijas audi, kas satur daudz iekaisuma šūnu (leukocītus, limfocītus, plazmocītus, gigantsūnas), kolagēnās šķiedras un fibroblastus. Preparātos bija novērojams daudz mazo asinsvadu. Visus preparātus raksturoja izteikta iekaisuma šūnu infiltrācija. Šo slāni var salīdzināt ar neizmainītas ādas dermas slāni. Holestatomas gadījumā atšķirībā no neizmainītas ādas saistaudi ir irdenāki, ar izteiktu iekaisuma šūnu infiltrāciju un vairāk vaskularizēti (sk. 2.2. attēlu).





**2.1. attēls. Cilvēka neizmainīta ārējās auss ejas āda, kontroles audi**

- E – daudzkārtains, plakans pārragots epitēlijs, virs kura redzams arī raga slānis;
  - S – saistaudi bez iekaisuma pazīmēm, kas atrodas zem epitēlija.
- Hematoksilīns un eoziņš,  $\times 200$



## 2.2. attēls. Pieauguša cilvēka holesteatoma

C – cistiskais slānis, kas sastāv no bezkodola epitēlija šūnām;

M – matrkss, kas ir hiperproliferatīvs daudzkārtains, plakans pārragots epitēlijs;

P – perimatrikss, kas ir zemepitēlija saistaudi jeb granuluācijas audi un sastāv no dažādām iekaisuma šūnām un irdeniem nenormētiem saistaudiem.

Materiāls iegūts no 58 gadus vecas sievietes.

Hematoksilīns un eozīns, × 200

## 2.2. Imūnhistoķīmisko marķieru raksturojums kontroles un pacientu grupās

### 2.2.1. Matrices metaloproteināzes un matrices metaloproteināžu audu inhibitori

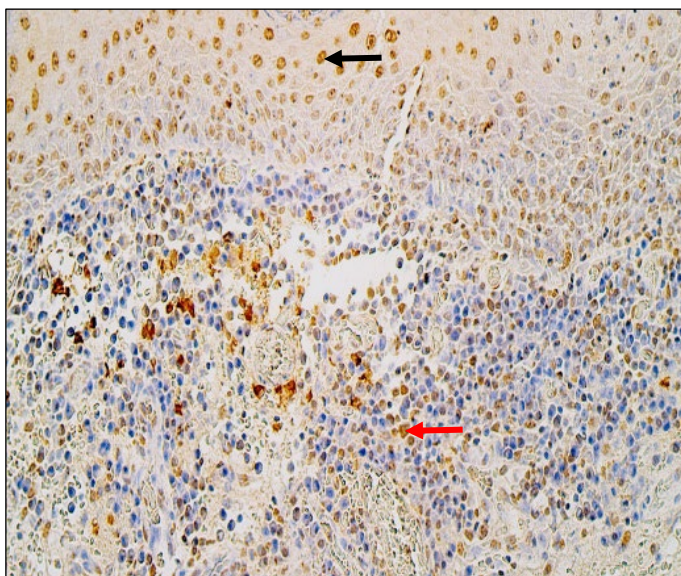
#### Matrices metaloproteināze 2

**Kontroles grupas** ādas epitēlijā kopumā bija novērojams rets (0/+) MMP-2 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums redzes laukā. Saistaudos tika konstatēts mazs (+) MMP-2 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums redzes laukā.

**Bērnu holesteatomas** matriciņā MMP-2 pozitīvas šūnas kopumā tika novērotas maz līdz vidēji daudz (+/+). Savukārt perimatriņā grupas mediānā bija mazs (+) pozitīvo šūnu daudzums redzes laukā.

**Pieaugušo holesteatomas** matriciņā un perimatriņā kopumā tika novērotas maz līdz vidēji daudz (+/++) MMP-2 pozitīvo šūnu (sk. 2.3. attēlu).

Netika novērotas statistiski ticamas atšķirības MMP-2 relatīvajā daudzumā starp bērnu un pieaugušo holesteatomas grupām ne matriciņā, ne perimatriņā. Lai arī relatīvais MMP-2 pozitīvo šūnu daudzums abu pacientu grupās bija lielāks nekā kontroles grupā, tomēr tas nesasniedza statistiski ticamas atšķirības (sk. 2.1., 2.2., 2.3. tabulu).



2.3. attēls. **Vidēji daudz (++) MMP-2 pozitīvu šūnu matriciņā (melna bultiņa) un maz līdz vidēji daudz (+/++) faktora pozitīvu šūnu perimatriņā (sarkana bultiņa)**

Pieauguša cilvēka holesteatoma.  
Materiāls iegūts no 27 gadus vecas sievietes holesteatomas.  
MMP-2 IHĶ,  $\times 250$

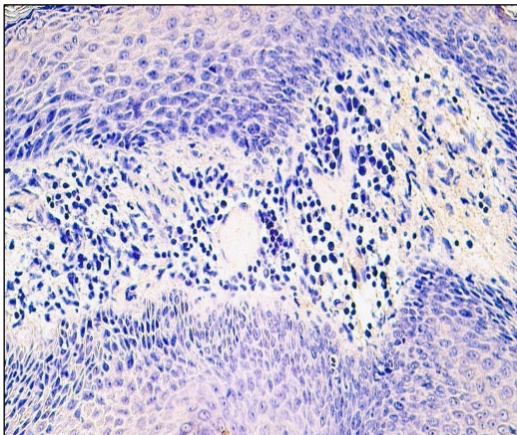
## Matrices metaloproteināze 9

**Kontroles grupas** ādas epitēlijā kopumā tika novērots mazs (+) MMP-9 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums, bet saistaudos grupas mediānā bija rets (0/+) MMP-9 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums.

**Bērnu holestatomas** matriksā MMP-9 pozitīvo šūnu skaita mediānā bija rets (0/+) pozitīvo šūnu relatīvais daudzums. Perimatriksā kopumā tika novērots mazāk rets (0–0/+) pozitīvo šūnu relatīvais daudzums (sk. 2.4. attēlu).

**Pieaugušo holestatomas** matriksā un perimatriksā kopumā tika novērots rets (0/+) MMP-9 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums.

Netika novērotas statistiski ticamas atšķirības starp MMP-9 relatīvo daudzumu bērnu un pieaugušo holestatomas matriksā un perimatriksā. Lai arī MMP-9 relatīvais daudzums kontroles grupas epitēlijā un saistaudos bija nedaudz lielāks nekā abās pacientu grupās, netika novērotas statistiski ticamas atšķirības starp kontroles grupu un abām pacientu grupām (sk. 2.1., 2.2., 2.3. tabulu).



2.4. attēls. **MMP-9 pozitīvo šūnu trūkums (0) matriksā un perimatriksā**

Bērna holestatoma. Materiāls iegūts no  
14 gadu veca zēna holestatomas.  
MMP-9 IHK, × 250

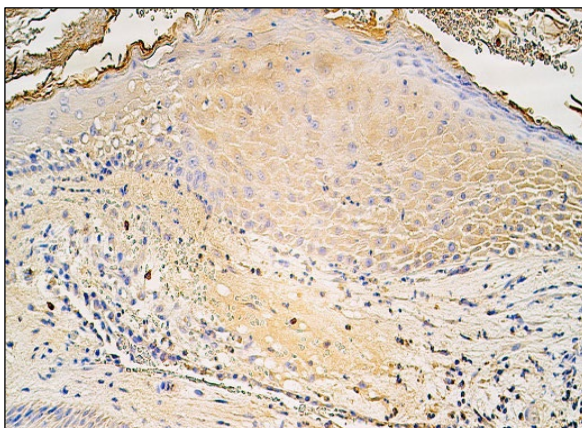
## Matrices metaloproteināzes audu inhibitoris 2

**Kontroles grupas** ādas epitēlijā kopumā tika novērotas maz līdz vidēji daudz (+/++) TIMP-2 pozitīvās šūnas, bet saistaudos – maz (+) faktorpozitīvo šūnu.

**Bērnu holesteatomas** matriksā un arī perimatriksā bija novērojams rets (0/+) TIMP-2 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums grupas ietvaros (sk. 2.5. attēlu).

Arī **pieaugušo holesteatomas** grupas mediānā gan matriksā, gan perimatriksā bija rets (0/+) TIMP-2 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums.

Starp bērnu un pieaugušo holesteatomas grupām netika novērotas statistiski ticamas atšķirības TIMP-2 relatīvajā daudzumā ne abu grupu matriksā, ne perimatriksā. Tika novērota tendence būt statistiski nozīmīgi palielinātam TIMP-2 relatīvajam daudzumam kontroles grupas epitēlijā, salīdzinot ar bērnu holesteatomas matriksu ( $p = 0,082$ ). Salīdzinot kontroles grupu ar pieaugušo holesteatomas grupu, netika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības, tomēr relatīvais TIMP-2 daudzums bija lielāks kontroles grupā (sk. 2.1., 2.2., 2.3. tabulu).



2.5. attēls. **Vidēji daudz (++) TIMP-2 pozitīvu šūnu matriksā un maz (+) faktora pozitīvu šūnu perimatriksā (bultiņa)**

Bērna holesteatoma. Materiāls iegūts no 14 gadu veca zēna holesteatomas. TIMP-2 IHĶ,  $\times 250$

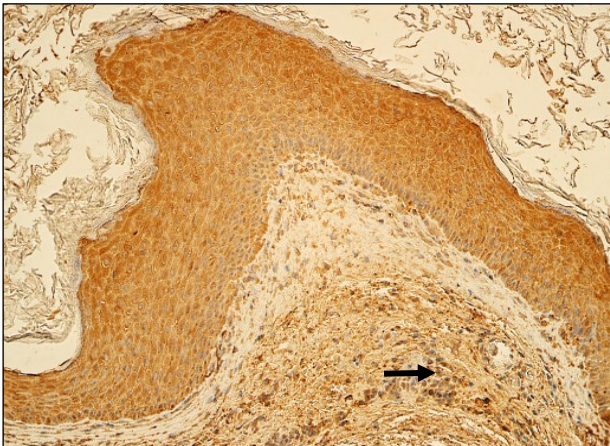
## Matrices metaloproteināzes audu inhibitors 4

**Kontroles grupā** epitēlijā TIMP-4 kopumā tika novērotas vidēji daudz līdz daudz (++)/++++). Saistaudos grupas mediānā bija vidēji daudz (++) TIMP-4 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums.

**Bērnu holestatomas** matriksā tika novērotas vidēji daudz līdz daudz (++)/++++) TIMP-4 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums, bet perimatriksā grupas mediānā bija vidēji daudz (++) TIMP-4 pozitīvo šūnu (sk. 2.6. attēlu).

**Pieaugušo holestatomas** grupā matriksā kopumā tika novērotas vidēji daudz līdz daudz (++)/++++) TIMP-4 pozitīvo šūnu un perimatriksā – vidēji daudz (++) TIMP-4 pozitīvo šūnu.

Visās grupās TIMP-4 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums bija līdzīgs un netika novērotas statistiski ticamas atšķirības starp kontroles, bērnu holestatomas un pieaugušo holestatomas grupām (sk. 2.1., 2.2., 2.3. tabulu).



2.6. attēls. **Daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) TIMP-4 pozitīvu šūnu matriksā un vidēji daudz (++) faktora pozitīvu šūnu (bultiņa) perimatriksā**

Bērņa holesteatoma. Materiāls iegūts no  
13 gadu veca zēna holestatomas.  
TIMP-4 IHĶ, × 200

2.1. tabula

**Remodelācijas faktoru daudzuma statistiskās atšķirības starp  
bērnu un pieaugušo holesteatomas grupām**

Audu faktors		<i>Kruskal-Wallis</i>	p vērtība
Bērnu grupa	Pieaugušo grupa		
MMP-2 matrikss	MMP-2 matrikss	0,415	> 0,999
MMP-2 perimatrikss	MMP-2 perimatrikss	0,986	0,972
MMP-9 matrikss	MMP-9 matrikss	-0,365	> 0,999
MMP-9 perimatrikss	MMP-9 perimatrikss	1,290	0,591
TIMP-2 matrikss	TIMP-2 matrikss	0,576	> 0,999
TIMP-2 perimatrikss	TIMP-2 perimatrikss	0,958	> 0,999
TIMP-4 matrikss	TIMP-4 matrikss	-0,205	> 0,999
TIMP-4 perimatrikss	TIMP-4 perimatrikss	0,159	> 0,999

Saīsinājumi: MMP-2 – matricē metaloproteināze 2; MMP-9 – matricē metaloproteināze 9; TIMP-2 – matricē metaloproteināzes audu inhibitors 2; TIMP-4 – matricē metaloproteināzes audu inhibitors 4.

2.2. tabula

**Remodelācijas faktoru daudzuma statistiskās atšķirības starp  
kontroles un bērnu holesteatomas grupām**

Audu faktors		<i>Kruskal-Wallis</i>	p vērtība
Kontroles grupa	Bērnu grupa		
MMP-2 epitēlijs	MMP-2 matrikss	1,005	0,945
MMP-2 saistaudi	MMP-2 perimatrikss	0,370	> 0,999
MMP-9 epitēlijs	MMP-9 matrikss	-1,761	0,235
MMP-9 saistaudi	MMP-9 perimatrikss	-1,713	0,260
TIMP-2 epitēlijs	TIMP-2 matrikss	-2,207	<b>0,082<sup>t</sup></b>
TIMP-2 saistaudi	TIMP-2 perimatrikss	-1,779	0,226
TIMP-4 epitēlijs	TIMP-4 matrikss	1,018	0,926
TIMP-4 saistaudi	TIMP-4 perimatrikss	1,354	0,527

Saīsinājumi: MMP-2 – matricē metaloproteināze 2; MMP-9 – matricē metaloproteināze 9; TIMP-2 – matricē metaloproteināzes audu inhibitors 2; TIMP-4 – matricē metaloproteināzes audu inhibitors 4.

Apzīmējumi: <sup>t</sup> – tendence būt statistiski nozīmīgai atšķirībai.

**Remodelācijas faktoru daudzuma statistiskās atšķirības starp kontroles un pieaugušo holesteatomas grupām**

Audu faktors		Kruskal-Wallis	p vērtība
Kontroles grupa	Pieaugušo grupa		
MMP-2 epitēlijs	MMP-2 matrikss	1,280	0,602
MMP-2 saistaudi	MMP-2 perimatrikss	1,023	0,919
MMP-9 epitēlijs	MMP-9 matrikss	-2,002	0,136
MMP-9 saistaudi	MMP-9 perimatrikss	-0,860	> 0,999
TIMP-2 epitēlijs	TIMP-2 matrikss	-1,826	0,203
TIMP-2 saistaudi	TIMP-2 perimatrikss	-1,145	0,756
TIMP-4 epitēlijs	TIMP-4 matrikss	0,883	> 0,999
TIMP-4 saistaudi	TIMP-4 perimatrikss	1,460	0,433

Saīsinājumi: MMP-2 – matricēs metaloproteināze 2; MMP-9 – matricēs metaloproteināze 9; TIMP-2 – matricēs metaloproteināzes audu inhibitors 2; TIMP-4 – matricēs metaloproteināzes audu inhibitors 4.

### 2.2.2. Proliferācijas marķieris Ki-67

**Kontroles grupā** divos gadījumos gan epitēlijā, gan saistaudos tika novērotas mazāk nekā retas (0–0/+) Ki-67 pozitīvas šūnas, bet pārējos gadījumos Ki-67 pozitīvas šūnas netika konstatētas (0).

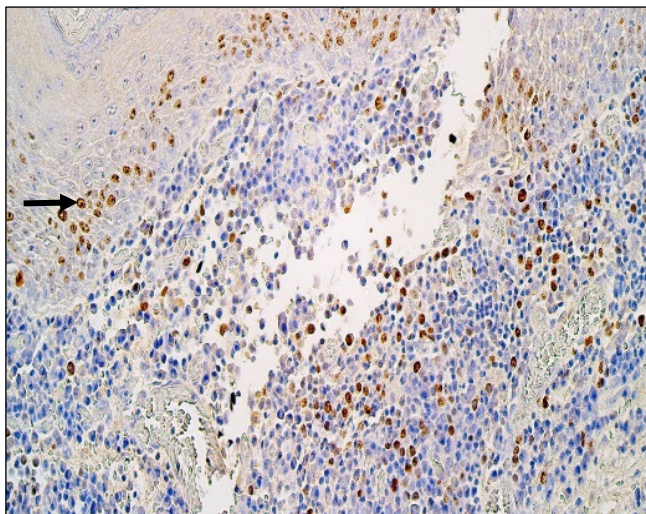
**Bērnu holesteatomas** matriksā kopumā tika novērots rets (0/+) Ki-67 pozitīvo šūnu daudzums, bet perimatriksā kopumā bija vērojams mazāk nekā rets (0–0/+) Ki-67 pozitīvo šūnu daudzums.

**Pieaugušo holesteatomas** matriksā kopumā tika novērots rets (0/+) Ki-67 pozitīvo šūnu daudzums, bet perimatriksā kopumā bija vērojams mazāk nekā rets (0–0/+) Ki-67 pozitīvo šūnu daudzums (sk. 2.7. attēlu).

Salīdzinot bērnu un pieaugušo holesteatomas grupas, netika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības Ki-67 pozitīvo šūnu relatīvajā daudzumā starp grupām. Tika novērots statistiski ticami palielināts Ki-67 pozitīvo šūnu daudzums bērnu holesteatomas matriksā salīdzinoši ar kontroles grupas epitēliju ( $p = 0,006$ ), bet perimatriksā, lai arī pozitīvo šūnu daudzums bija lielāks nekā



saistaudos, statistiski nozīmīga atšķirība netika novērota. Pieaugušo holesteatomas matriksā un perimatriksā bija novērojams statistiski ticami palielināts Ki-67 pozitīvo šūnu daudzums, salīdzinot ar kontroles grupas epitēliju un saistaudiem ( $p = 0,001$ ;  $p = 0,030$ ) (sk. 2.4. tabulu).



2.7. attēls. Maz līdz vidēji daudz (+/++) Ki-67 pozitīvu šūnu holesteatomas matriksā (bultiņa) un perimatriksā

Pieauguša cilvēka holesteatoma.

Materiāls iegūts no 27 gadus vecas sievietes holesteatomas.

Ki-67 IHĶ,  $\times 200$

2.4. tabula

**Proliferācijas marķiera Ki-67 daudzuma statistiskās atšķirības starp bērnu, pieaugušo holesteatomas un kontroles grupām**

Audu faktors		Kruskal-Wallis	p vērtība
Bērnu grupa	Pieaugušo grupa		
Ki-67 matrikss	Ki-67 matrikss	0,886	> 0,999
Ki-67 perimatrikss	Ki-67 perimatrikss	0,908	> 0,999
Kontroles grupa		Kruskal-Wallis	p vērtība
Bērnu grupa			
Ki-67 epitēlijs	Ki-67 matrikss	3,110	<b>0,006*</b>
Ki-67 saistaudi	Ki-67 perimatrikss	1,977	0,144

## 2.4. tabulas turpinājums

Audu faktors		<i>Kruskal-Wallis</i>	p vērtība
Kontroles grupa	Pieaugušo grupa		
Ki-67 epitēlijs	Ki-67 matrikss	3,697	<b>0,001*</b>
Ki-67 saistaudi	Ki-67 perimatrikss	2,577	<b>0,030*</b>

Saīsinājumi: Ki-67 – *Kiel-67*.

Apzīmējumi: \* – statistiski nozīmīga atšķirība.

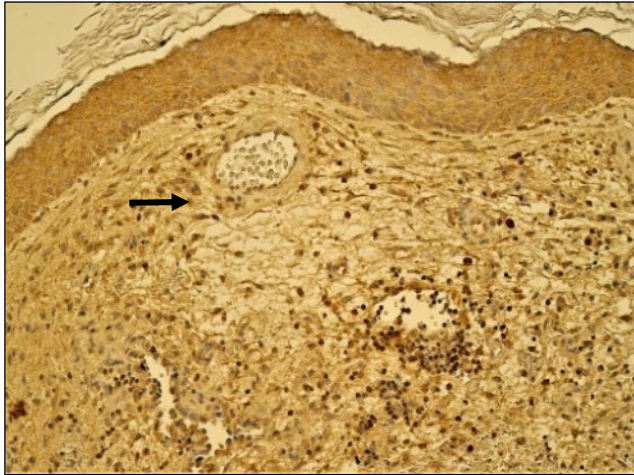
### 2.2.3. Nukleārais faktors kapa beta

Kopumā gan **kontroles grupas** epitēlijā, gan saistaudos tika novērots rets (0/+) NF- $\kappa$ B pozitīvo šūnu daudzums.

**Bērnu holesteatomas** matriksā kopumā tika novērotas vidēji daudz (++) NF- $\kappa$ B pozitīvas šūnas. Perimatriksā tika novērots mazs (+) NF- $\kappa$ B pozitīvo šūnu daudzums (sk. 2.8. attēlu).

**Pieaugušo holesteatomas** matriksā kopumā tika novērotas vidēji daudz (++) NF- $\kappa$ B pozitīvas šūnas, bet perimatriksā grupas mediāna tika noteikta kā rets (0/+) NF- $\kappa$ B pozitīvo šūnu daudzums.

Salīdzinot bērnu holesteatomas un pieaugušo holesteatomas grupas un NF- $\kappa$ B pozitīvo šūnu daudzumu, netika atrasta statistiski nozīmīga atšķirība starp grupām. Tika novērots statistiski ticami palielināts NF- $\kappa$ B pozitīvo šūnu daudzums bērnu un pieaugušo holesteatomas matriksā, salīdzinot ar kontroles grupas epitēliju ( $p = 0,011$ ;  $p = 0,013$ ). Salīdzinot bērnu un pieaugušo holesteatomas perimatriksu ar kontroles grupas ādas saistaudiem, netika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības (sk. 2.5. tabulu).



2.8. attēls. Daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) NF-κβ pozitīvu šūnu holesteatomas matricās un vidēji daudz līdz daudz (++/+++) perimatriksā (bultiņa)

Bērna holesteatoma. Materiāls iegūts no 14 gadu veca zēna holesteatomas. NF-κβ IHĶ, × 250

2.5. tabula

**Transkripcijas faktora NF-κβ daudzuma statistiskās atšķirības starp bērnu, pieaugušo holesteatomas un kontroles grupām**

Audu faktors		Kruskal-Wallis	p vērtība
Bērnu grupa	Pieaugušo grupa		
NF-κβ matricss	NF-κβ matricss	-0,079	> 0,999
NF-κβ perimatrikss	NF-κβ perimatrikss	0,039	> 0,999
Kontroles grupa	Bērnu grupa	Kruskal-Wallis	p vērtība
NF-κβ epitēlijs	NF-κβ matricss	2,915	<b>0,011*</b>
NF-κβ saistaudi	NF-κβ perimatrikss	1,779	0,226
Kontroles grupa	Pieaugušo grupa	Kruskal-Wallis	p vērtība
NF-κβ epitēlijs	NF-κβ matricss	2,864	<b>0,013*</b>
NF-κβ saistaudi	NF-κβ perimatrikss	1,805	0,213

Saīsinājumi: NF-κβ – nukleārais faktors kapa beta.

Apzīmējumi: \* – statistiski nozīmīga atšķirība.

## 2.2.4. Iekaisumu veicinošie un nomācošie citokīni

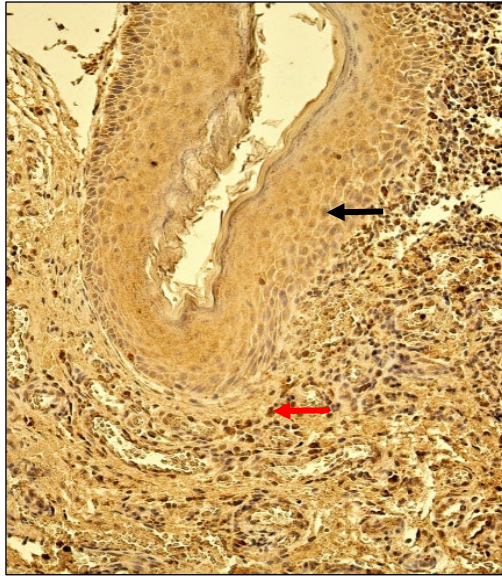
### Interleikīns 1 alfa

**Kontroles grupā** kopumā gan epitēlijā, gan saistaudos tika novērots rets (0/+) IL-1 $\alpha$  pozitīvo šūnu daudzums.

**Bērnu grupā** holesteatomas matriksā tika novērots mazs līdz vidēji daudz (+/++) pozitīvo šūnu daudzums, bet perimatriksā kopumā tika novērots rets (0/+) IL-1 $\alpha$  pozitīvo šūnu daudzums (sk. 2.9. attēlu).

**Pieaugušo holesteatomas** grupā matriksā kopumā tika novērots maz līdz vidēji daudz (+/++) IL-1 $\alpha$  pozitīvu šūnu. Perimatriksā tika novērots mazs (+) IL- 1 $\alpha$  pozitīvo šūnu daudzums.

Netika novērota statistiski ticama atšķirība starp IL-1 $\alpha$  relatīvo daudzumu bērnu un pieaugušo holesteatomās. Bērnu un pieaugušo holesteatomas grupās tika novērots palielināts IL-1 $\alpha$  daudzums, salīdzinot ar kontroles grupu, tomēr tas nerasniedza statistisku nozīmību (sk. 2.6. tabulu).



2.9. attēls. Daudz (+++) IL-1 $\alpha$  pozitīvu šūnu holesteatomas matiksā (melna bultiņa) un daudz (+++) perimatriksā (sarkana bultiņa)

Bērna holesteatoma. Materiāls iegūts no 13 gadu veca zēna holesteatomas.  
IL-1 $\alpha$  IHĶ,  $\times 200$

## Interleikīns 10

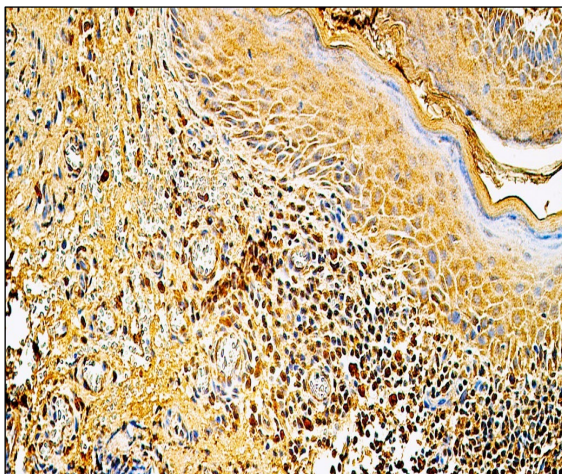
**Kontroles grupā** kopumā gan epitēlijā, gan saistaudos tika novērots vidēji daudz (++) IL-10 pozitīvo šūnu.

**Bērnu holesteatomas** matiksā tika novērots maz līdz vidēji daudz (+/++) IL-10 pozitīvo šūnu, bet perimatriksā kopumā tika novērots mazs (+) IL-10 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums (sk. 2.10. attēlu).

**Pieaugušo holesteatomas** grupā matiksā kopumā tika novērots maz līdz vidēji daudz (+/++) IL-10 pozitīvo šūnu un perimatriksā maz (+) IL-10 pozitīvo šūnu.

Salīdzinot bērnu un pieaugušo holesteatomas, netika novērota statistiski ticama atšķirība IL-10 pozitīvo šūnu relatīvajā daudzumā starp šīm abām

grupām. Salīdzinot kontroles grupu ar abām pacientu grupām, tika novērots, ka IL-10 pozitīvās šūnas kontroles grupas materiālā ir vairāk nekā abu pacientu grupās, tomēr tas nerasniedza statistiski nozīmīgu atšķirību (sk. 2.6. tabulu).



2.10. attēls. Daudz (+++) IL-10 pozitīvu šūnu holesteatomas matriksā un vidēji daudz līdz daudz (++/+++) perimatriksā

Bērna holesteatoma. Materiāls iegūts no 13 gadu veca zēna holesteatomas. IL-10 IHĶ, × 250

2.6. tabula

Iekaisuma veicinošo un nomācošo citokīnu daudzuma statistiskās atšķirības starp bērnu, pieaugušo holesteatomas un kontroles grupām

Audu faktors		<i>Kruskal-Wallis</i>	p vērtība
Bērnu grupa	Pieaugušo grupa		
IL-1α matrikss	IL-1α matrikss	-0,039	> 0,999
IL-1α perimatrikss	IL-1α perimatrikss	0,717	> 0,999
IL-10 matrikss	IL-10 matrikss	0,043	> 0,999
IL-10 perimatrikss	IL-10 perimatrikss	0,868	> 0,999
Kontroles grupa	Bērnu grupa	<i>Kruskal-Wallis</i>	p vērtība
IL-1α epitēlijs	IL-1α matrikss	1,773	0,229

Adu faktors		<i>Kruskal-Wallis</i>	p vērtība
Kontroles grupa	Bērnu grupa		
IL-1 $\alpha$ saistaudi	IL-1 $\alpha$ perimatrikss	0,526	> 0,999
IL-10 epitēlijs	IL-10 matrikss	-0,456	> 0,999
IL-10 saistaudi	IL-10 perimatrikss	-1,780	0,225
Kontroles grupa	Pieaugušo grupa	<i>Kruskal-Wallis</i>	p vērtība
IL-1 $\alpha$ epitēlijs	IL-1 $\alpha$ matrikss	1,747	0,242
IL-1 $\alpha$ saistaudi	IL-1 $\alpha$ perimatrikss	1,000	0,952
IL-10 epitēlijs	IL-10 matrikss	-0,427	> 0,999
IL-10 saistaudi	IL-10 perimatrikss	-1,205	0,684

Saīsinājumi: IL-1 $\alpha$  – interleikīns 1 alfa; IL-10 – interleikīns 10.

## 2.2.5. Cilvēka beta defensīni

### Cilvēka beta defensīns 2

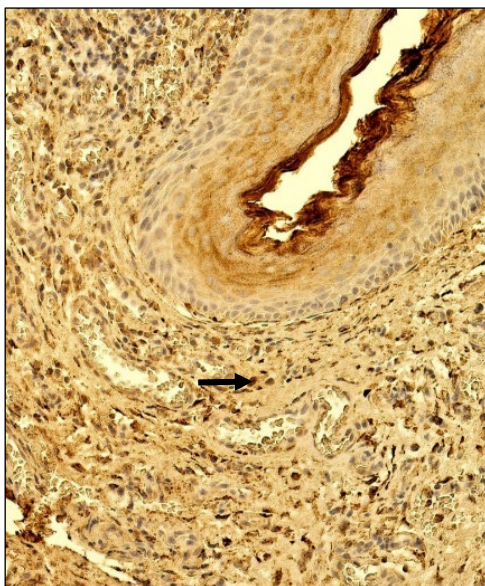
**Kontroles grupas** ādas epitēlijā kopumā tika novērots mazs (+) H $\beta$ D-2 pozitīvo šūnu daudzums, bet saistaudos tika novērots mazāk nekā rets (0-0/+ ) H $\beta$ D-2 pozitīvo šūnu daudzums.

**Bērnu holesteatomas** matriksā kopumā tika novērots mazs līdz vidēji daudz (+/++) H $\beta$ D-2 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums, bet perimatriksā tika novērots rets (0/+) H $\beta$ D-2 pozitīvo šūnu daudzums (sk. 2.11. attēlu).

**Pieaugušo holesteatomas** matriksā kopumā tika novērots maz līdz vidēji daudz (+/++) H $\beta$ D-2 pozitīvo šūnu. Perimatriksā bija vērojams mazs (+) H $\beta$ D-2 pozitīvo šūnu daudzums.

Salīdzinot bērnu un pieaugušo holesteatomas grupas, netika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības H $\beta$ D-2 pozitīvo šūnu daudzumā abās grupās. Salīdzinot bērnu un pieaugušo holesteatomas grupas ar kontroles grupu, tika novērots statistiski ticami palielināts H $\beta$ D-2 pozitīvo šūnu daudzums abu pacientu grupu holesteatomas perimatriksā, salīdzinot ar kontroles ādas saistaudiem ( $p = 0,038$  un  $p = 0,015$ ). Arī holesteatomas matriksā H $\beta$ D-2

daudzums bija lielāks, nekā ādas epitēlijā, tomēr tas nesasniedza statistisku ticamību (sk. 2.7. tabulu).



2.11. attēls. **Vidēji daudz (++) HβD-2 pozitīvu šūnu holesteatomas matriksā un vidēji daudz (++) perimatriksā (bultiņa)**

Bērna holesteatoma. Materiāls iegūts no  
9 gadus vecas meitenes holesteatomas.  
HβD-2 IHĶ, × 200

#### **Cilvēka beta defensīns 4**

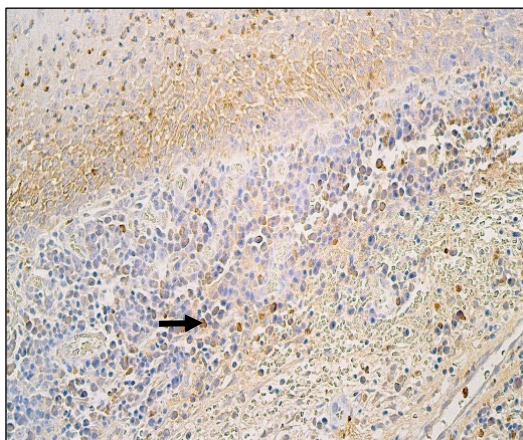
Kopumā **kontroles grupas** epitēlijā tika novērots mazs (+) HβD-4 pozitīvo šūnu daudzums, bet saistaudos – rets (0/+) HβD-4 pozitīvo šūnu daudzums.



**Bērnu holesteatomas** matriksā kopumā tika novērots mazāk nekā rets (0–0/+) HβD-4 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums. Perimatriksā tika novērots rets (0/+) HβD-4 pozitīvo šūnu daudzums.

**Pieaugušo holesteatomas** matriksā un perimatriksā kopumā tika novērots rets (0/+) HβD-4 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums (sk. 2.12. attēlu).

Netika atrastas statistiski ticamas HβD-4 pozitīvo šūnu daudzuma atšķirības starp bērnu un pieaugušo holesteatomas grupām. Salīdzinot bērna holesteatomas grupu ar kontroles grupu, tika novērota tendence būt statistiski ticami palielinātam HβD-4 pozitīvo šūnu skaitam kontroles grupas epitēlijā, salīdzinot ar holesteatomas matriksu ( $p = 0,099$ ). Salīdzinot pieaugušo holesteatomas grupu ar kontroles grupu, tika novērots HβD-4 pozitīvo šūnu palielināts daudzums kontroles grupas audos, bet tas nebija statistiski ticami palielināts (sk. 2.7. tabulu).



2.12. attēls. **Vidēji daudz līdz daudz (++/+++)  
HβD-4 pozitīvo šūnu holesteatomas matriksā  
un maz (+) perimatriksā (bultiņa)**

Pieauguša cilvēka holesteatoma. Materiāls iegūts no  
27 gadus vecas sievietes holesteatomas.  
HβD-4 IHĶ,  $\times 250$

**Cilvēka beta defensīnu daudzuma statistiskās atšķirības starp bērnu, pieaugušo holesteatomas un kontroles grupām**

<b>Audu faktors</b>		<i>Kruskal-Wallis</i>	<b>p vērtība</b>
<b>Bērnu grupa</b>	<b>Pieaugušo grupa</b>		
HβD-2 matrikss	HβD-2 matrikss	0,587	> 0,999
HβD-2 perimatrikss	HβD-2 perimatrikss	0,480	> 0,999
HβD-4 matrikss	HβD-4 matrikss	0,868	> 0,999
HβD-4 perimatrikss	HβD-4 perimatrikss	-0,719	> 0,999
<b>Kontroles grupa</b>	<b>Bērnu grupa</b>	<i>Kruskal-Wallis</i>	<b>p vērtība</b>
HβD-2 epitēlijs	HβD-2 matrikss	1,339	0,542
HβD-2 saistaudi	HβD-2 perimatrikss	2,498	<b>0,038*</b>
HβD-4 epitēlijs	HβD-4 matrikss	-2,132	<b>0,099<sup>t</sup></b>
HβD-4 saistaudi	HβD-4 perimatrikss	-0,627	> 0,999
<b>Kontroles grupa</b>	<b>Pieaugušo grupa</b>	<i>Kruskal-Wallis</i>	<b>p vērtība</b>
HβD-2 epitēlijs	HβD-2 matrikss	1,727	0,253
HβD-2 saistaudi	HβD-2 perimatrikss	2,815	<b>0,015*</b>
HβD-4 epitēlijs	HβD-4 matrikss	-1,558	0,358
HβD-4 saistaudi	HβD-4 perimatrikss	-1,103	0,811

Saīsinājumi: HβD-2 – cilvēka beta defensīns 2; HβD-4 – cilvēka beta defensīns 4. Apzīmējumi: \* – statistiski nozīmīga atšķirība; <sup>t</sup> – tendence būt statistiski nozīmīgai atšķirībai.

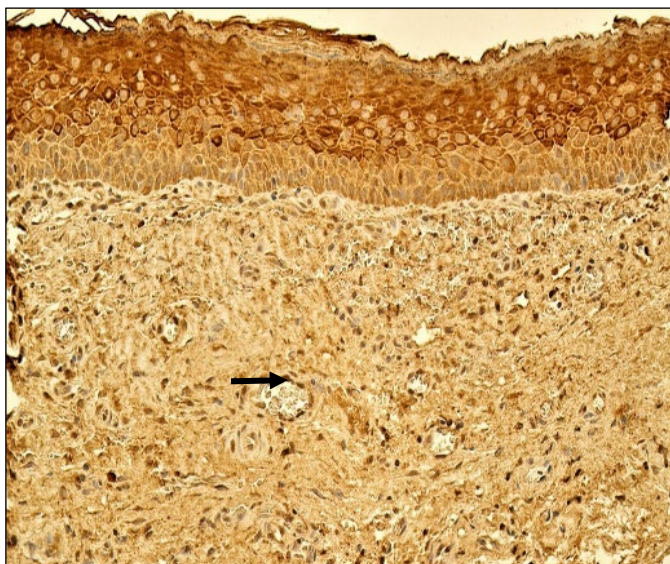
### 2.2.6. Vaskulārais endoteliālais augšanas faktors

VEGF relatīvais daudzums **kontroles grupas** epitēlijā kopumā bija vidēji daudz līdz daudz (++)/+++). Saistaudos tika novērots mazs (+) VEGF pozitīvo endoteliocītu daudzums.

**Bērnu holesteatomas** matriksā kopumā tika novērots vidēji daudz (++) VEGF pozitīvo šūnu, bet perimatriksā tika novērots rets (0/+) VEGF pozitīvo endoteliocītu daudzums (sk. 2.13. attēlu).

**Pieaugušo holesteatomas** grupā matriksā kopumā tika novērotas maz līdz vidēji daudz (+/++) VEGF pozitīvo šūnu. Perimatriksā tika novērots rets (0/+) VEGF pozitīvo endoteliocītu daudzums.

Salīdzinot bērnu holesteatomas un pieaugušo holesteatomas grupas, netika novērotas statistiski ticamas atšķirības starp abām grupām. Salīdzinot bērnu pacientu grupu ar kontroles grupu, arī netika novērotas statistiski ticamas atšķirības. Salīdzinot pieaugušo holesteatomas grupu ar kontroles grupu, tika novērota tendence būt statistiski nozīmīgi palielinātam VEGF pozitīvo šūnu skaitam kontroles grupas epitēlijā salīdzinot ar holesteatomas matriksu ( $p = 0,096$ ), bet šāda tendence nebija novērojama, salīdzinot kontroles grupas saistaudus un holesteatomas perimatriksu (sk. 2.8. tabulu).



2.13. attēls. **Daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) VEGF pozitīvu šūnu holesteatomas matriksā un vidēji daudz līdz daudz (++/+++)** perimatriksā – gan endoteliocīti (bultiņa), gan iekaisuma šūnas

Bērņa holesteatoma. Materiāls iegūts no 16 gadu vecas meitenes holesteatomas.  
VEGF IHĶ,  $\times 250$

**VEGF daudzuma statistiskās atšķirības starp  
bērnu, pieaugušo holesteatomas un kontroles grupām**

<b>Audu faktors</b>		<i>Kruskal-Wallis</i>	<b>p vērtība</b>
<b>Bērnu grupa</b>	<b>Pieaugušo grupa</b>		
VEGF matrikss	VEGF matrikss	-0,694	> 0,999
VEGF perimatrikss	VEGF perimatrikss	0,486	> 0,999
<b>Kontroles grupa</b>	<b>Bērnu grupa</b>	<i>Kruskal-Wallis</i>	<b>p vērtība</b>
VEGF epitēlijs	VEGF matrikss	-1,687	0,275
VEGF saistaudi	VEGF perimatrikss	-0,973	0,991
<b>Kontroles grupa</b>	<b>Pieaugušo grupa</b>	<i>Kruskal-Wallis</i>	<b>p vērtība</b>
VEGF epitēlijs	VEGF matrikss	-2,146	<b>0,096<sup>t</sup></b>
VEGF saistaudi	VEGF perimatrikss	-0,652	> 0,999

Saīsinājumi: VEGF – vaskulārais endoteliālais augšanas faktors.

Apzīmējumi: <sup>t</sup> – tendence būt statistiski nozīmīgai atšķirībai.

### 2.2.7. *Sonic hedgehog* gēna proteīns

**Kontroles grupā** epitēlijā kopumā tika novērotas maz līdz vidēji daudz (+/++) SHH pozitīvas šūnas. Ādas saistaudos kopumā tika novērots maz (+) SHH pozitīvo šūnu.

**Bērnu holesteatomas** matriksā tika novērots vidēji daudz līdz daudz (+/++) SHH pozitīvo šūnu, bet perimatriksā kopumā tika novērots mazs līdz vidēji daudz (+/++) SHH pozitīvo šūnu relatīvais daudzums.

**Pieaugušo holesteatomas** matriksā kopumā tika novērotas vidēji daudz līdz daudz (+/++) SHH pozitīvo šūnu, bet perimatriksā – vidēji daudz (++) SHH pozitīvo šūnu relatīvais daudzums (sk. 2.14. attēlu).

Salīdzinot bērnu un pieaugušo holesteatomas grupas, netika atrastas statistiski nozīmīgas atšķirības starp tām. Salīdzinot gan bērnu, gan pieaugušo holesteatomas grupas ar kontroles grupu, abos gadījumos tika novērots statistiski ticami palielināts SHH šūnu daudzums holesteatomas perimatriksā, salīdzinot ar kontroles ādas saistaudiem ( $p = 0,011$  un  $p = 0,005$ ). Salīdzinot abu pacientu grupu holesteatomas matriksu ar kontroles ādas epitēliju, netika novērotas

statistiski ticamas atšķirības starp grupām, bet holesteatomas grupās SHH pozitīvo šūnu bija vairāk (sk. 2.9. tabulu).



2.14. attēls. Daudz (+++) SHH pozitīvu šūnu holesteatomas matriksā un maz līdz vidēji daudz (+/++) perimatriksā (bultiņa)

Pieauguša cilvēka holesteatoma. Materiāls iegūts no 27 gadus vecas sievietes holesteatomas.  
SHH IHĶ, × 250

2.9. tabula

### SHH daudzuma statistiskās atšķirības starp bērnu, pieaugušo holesteatomas un kontroles grupām

Audu faktors		Kruskal-Wallis	p vērtība
Bērnu grupa	Pieaugušo grupa		
SHH matrikss	SHH matrikss	0,482	> 0,999
SHH perimatrikss	SHH perimatrikss	0,363	> 0,999
Kontroles grupa	Bērnu grupa	Kruskal-Wallis	p vērtība
SHH epitēlijs	SHH matrikss	0,999	0,954
SHH saistaudi	SHH perimatrikss	2,906	<b>0,011*</b>
Kontroles grupa	Pieaugušo grupa	Kruskal-Wallis	p vērtība
SHH epitēlijs	SHH matrikss	1,318	0,563
SHH saistaudi	SHH perimatrikss	3,146	<b>0,005*</b>

Saīsinājumi: SHH – *Sonic hedgehog* gēna proteīns.

Apzīmējumi: \* – statistiski nozīmīga atšķirība.

## 2.3. Datu statistiskās korelācijas

### 2.3.1. Datu statistiskās korelācijas kontroles grupā

Kontroles grupā tika novērotas 29 statistiski nozīmīgas korelācijas.

No tām 20 statistiski nozīmīgas korelācijas bija ļoti ciešas pozitīvas ( $r_s = 0,8-1,0$ ). Divas statistiski ticamas korelācijas bija ļoti ciešas negatīvas ( $r_s = -1,0-0,8$ ), un septiņas statistiski nozīmīgas bija ciešas pozitīvas korelācijas ( $r_s = 0,6-0,8$ ).

Ciešākās **statistiski nozīmīgākās korelācijas** kontroles grupā ir apkopotas 2.10. tabulā.

2.10. tabula

**Statistiski nozīmīgas korelācijas starp dažādiem audu faktoriem kontroles grupā**

Korelācijas ciešums	Audu faktori starp kuriem noteikta korelācija	<i>Spearman</i> korelācijas koeficients	p vērtība
Ļoti cieša pozitīva korelācija (0,8–1,0)	VEGF epitēlijs un HβD-2 epitēlijs	<b>0,971</b>	< 0,001
	TIMP-2 epitēlijs un NF-κβ epitēlijs	<b>0,925</b>	0,003
	MMP-9 epitēlijs un SHH epitēlijs	<b>0,924</b>	0,003
	TIMP-2 saistaudi un HβD-2 epitēlijs	<b>0,921</b>	0,003
	VEGF epitēlijs un VEGF saistaudi	<b>0,911</b>	0,004
	MMP-9 epitēlijs un SHH saistaudi	<b>0,896</b>	0,006
	IL-10 epitēlijs un IL-10 saistaudi	<b>0,891</b>	0,007
	TIMP-2 saistaudi un VEGF epitēlijs	<b>0,885</b>	0,008
	TIMP-4 saistaudi un SHH epitēlijs	<b>0,882</b>	0,009
	HβD-4 epitēlijs un HβD-4 saistaudi	<b>0,870</b>	0,011
	TIMP-4 epitēlijs un TIMP-4 saistaudi	<b>0,868</b>	0,011
	VEGF saistaudi un HβD-2 epitēlijs	<b>0,856</b>	0,014
	SHH epitēlijs un NF-κβ epitēlijs	<b>0,851</b>	0,015
	TIMP-4 saistaudi un NF-κβ saistaudi	<b>0,845</b>	0,017
	TIMP-2 saistaudi un VEGF saistaudi	<b>0,845</b>	0,017
	MMP-2 epitēlijs un TIMP-2 epitēlijs	<b>0,833</b>	0,020
	NF-κβ epitēlijs un NF-κβ saistaudi	<b>0,827</b>	0,022
TIMP-2 epitēlijs un SHH epitēlijs	<b>0,824</b>	0,023	

Korelācijas ciešums	Audu faktori starp kuriem noteikta korelācija	<i>Spearman</i> korelācijas koeficients	p vērtība
Ļoti cieša pozitīva korelācija (0,8–1,0)	SHH epitēlijs un NF-κβ saistaudi	<b>0,819</b>	0,024
	TIMP-4 epitēlijs un SHH epitēlijs	<b>0,811</b>	0,027
Ļoti cieša negatīva korelācija (-1,0– -0,8)	IL-1α epitēlijs IL-10 saistaudi	<b>-0,829</b>	0,021
	MMP-2 epitēlijs un IL-1α saistaudi	<b>-0,808</b>	0,028

Saīsinājumi: MMP-2 – matricē metaloproteināze 2; MMP-9 – matricē metaloproteināze 9; TIMP-2 – matricē metaloproteināzes audu inhibitors 2; TIMP-4 – matricē metaloproteināzes audu inhibitors 4; NF-κβ – nukleārais faktors kapa beta; IL-1α – interleikīns 1 alfa; IL-10 – interleikīns 10; HβD-2 – cilvēka beta defensīns 2; HβD-4 – cilvēka beta defensīns 4; VEGF – vaskulārais endoteliālais augšanas faktors; SHH – *Sonic hedgehog* gēna proteīns.

### 2.3.2. Datu statistiskā korelācijas bērnu pacientu grupā

Bērnu holecistomas grupā kopumā tika novērotas 174 statistiski nozīmīgas ļoti ciešas, ciešas, vidēji ciešas un vājas pozitīvas korelācijas.

No visām statistiski nozīmīgajām korelācijām sešas bija ļoti ciešas pozitīvas korelācijas ( $r_s = 0,8-1,0$ ), 62 bija ciešas pozitīvas korelācijas ( $r_s = 0,6-0,8$ ). Vidēji ciešu pozitīvu korelāciju ( $r_s = 0,4-0,6$ ) daudzums bija 104, un statistiski nozīmīgas vājas pozitīvas korelācijas ( $r_s = 0,2-0,4$ ) bija divas.

Ciešākās **statistiski nozīmīgās korelācijas** bērnu holecistomas grupā apkopotas 2.11. tabulā.

**Statistiski nozīmīgas korelācijas starp  
dažādiem audu faktoriem bērnu holesteatomas grupā**

Korelācijas ciešums	Audu faktori, starp kuriem noteikta korelācija	<i>Spearman</i> korelācijas koeficients	p vērtība
Ļoti cieša pozitīva korelācija (0,8–1,0)	TIMP-4 matrikss un TIMP-4 perimatrikss	<b>0,841</b>	< 0,001
	IL-10 matrikss un H $\beta$ D-2 matrikss	<b>0,828</b>	< 0,001
	IL-1 $\alpha$ matrikss un NF- $\kappa$ $\beta$ matrikss	<b>0,827</b>	< 0,001
	SHH matrikss un SHH perimatrikss	<b>0,813</b>	< 0,001
	SHH matrikss un Ki-67 matrikss	<b>0,803</b>	< 0,001
	MMP-2 matrikss un MMP-2 perimatrikss	<b>0,803</b>	< 0,001
Cieša pozitīva korelācija (0,6–0,8)	MMP-2 matrikss un SHH matrikss	0,786	< 0,001
	MMP-2 perimatrikss un SHH matrikss	0,786	< 0,001
	Ki-67 matrikss un Ki-67 perimatrikss	0,780	< 0,001
	SHH matrikss un NF- $\kappa$ $\beta$ matrikss	0,753	< 0,001
	NF- $\kappa$ $\beta$ matrikss un H $\beta$ D-2 matrikss	0,750	< 0,001
	H $\beta$ D-2 matrikss un H $\beta$ D-2 perimatrikss	0,748	< 0,001
	SHH perimatrikss un Ki-67 matrikss	0,746	< 0,001
	VEGF matrikss un VEGF perimatrikss	0,745	< 0,001
	TIMP-4 matrikss un NF- $\kappa$ $\beta$ matrikss	0,738	< 0,001
	NF- $\kappa$ $\beta$ matrikss un Ki-67 matrikss	0,726	< 0,001
	TIMP-4 perimatrikss un IL-10 perimatrikss	0,721	< 0,001
	IL-1 $\alpha$ matrikss un IL-10 perimatrikss	0,720	< 0,001
	IL-1 $\alpha$ matrikss un IL-1 $\alpha$ perimatrikss	0,716	< 0,001
	MMP-9 perimatrikss un IL-1 $\alpha$ perimatrikss	0,714	< 0,001
	IL-1 $\alpha$ perimatrikss un VEGF perimatrikss	0,714	< 0,001
	MMP-9 matrikss un MMP-9 perimatrikss	0,710	< 0,001
	IL-1 $\alpha$ matrikss un IL-10 matrikss	0,709	< 0,001
	SHH matrikss un NF- $\kappa$ $\beta$ perimatrikss	0,702	< 0,001
IL-1 $\alpha$ matrikss un H $\beta$ D-2 matrikss	0,700	< 0,001	

Saīsinājumi: MMP-2 – matricē metaloproteināze 2; MMP-9 – matricē metaloproteināze 9; TIMP-4 – matricē metaloproteināzes audu inhibitors 4; NF- $\kappa$  $\beta$  – nukleārais faktors kapa beta; IL-1 $\alpha$  – interleikīns 1 alfa; IL-10 – interleikīns 10; H $\beta$ D-2 – cilvēka beta defēnsīns 2; VEGF – vaskulārais endoteliālais augšanas faktors; SHH – *Sonic hedgehog* gēna proteīns.



### 2.3.3. Datu statistiskās korelācijas pieaugušo pacientu grupā

Pieaugušo holesteatomas grupā kopumā tika novērotas 76 statistiski nozīmīgas korelācijas.

No tām četras bija ļoti ciešas pozitīvas korelācijas ( $r_s = 0,8-1,0$ ). 24 gadījumos tika novērotas ciešas pozitīvas korelācijas ( $r_s = 0,6-0,8$ ). Vidēji ciešu pozitīvu korelāciju ( $r_s = 0,4-0,6$ ) daudzums bija 46, un statistiski nozīmīgas vājas pozitīvas korelācijas ( $r_s = 0,2-0,4$ ) bija divas.

Ciešākās **statistiski nozīmīgās korelācijas** pieaugušo holesteatomas grupā apkopotas 2.12. tabulā.

2.12. tabula

**Statistiski nozīmīgas korelācijas starp dažādiem audu faktoriem pieaugušo holesteatomas grupā**

Korelācijas ciešums	Audu faktori, starp kuriem noteikta korelācija	<i>Spearman</i> korelācijas koeficients	p vērtība
Ļoti cieša pozitīva korelācija (0,8–1,0)	IL-10 matrkss un HβD-2 matrkss	<b>0,841</b>	< 0,001
	IL-1α matrkss un HβD-2 matrkss	<b>0,827</b>	< 0,001
	IL-1α matrkss un IL-10 matrkss	<b>0,813</b>	< 0,001
	IL-10 matrkss un IL-10 perimatrkss	<b>0,801</b>	< 0,001
Cieša pozitīva korelācija (0,6–0,8)	MMP-9 perimatrkss un NF-κβ perimatrkss	0,790	< 0,001
	IL-1α matrkss un IL-10 perimatrkss	0,762	< 0,001
	IL-10 perimatrkss un NF-κβ perimatrkss	0,751	< 0,001
	TIMP-4 perimatrkss un NF-κβ perimatrkss	0,749	< 0,001
	NF-κβ perimatrkss un HβD-2 perimatrkss	0,748	< 0,001
	MMP-2 matrkss un SHH matrkss	0,719	< 0,001

Saīsinājumi: MMP-2 – matrkces metaloproteināze 2; MMP-9 – matrkces metaloproteināze 9; TIMP-4 – matrkces metaloproteināzes audu inhibitors 4; NF-κβ – nukleārais faktors kapa beta; IL-1α – interleikīns 1 alfa; IL-10 – interleikīns 10; HβD-2 – cilvēka beta defēnsīns 2; SHH – *Sonic hedgehog* gēna proteīns.

### 3. Diskusija

Zinātniskajā literatūrā atrodams relatīvi plašs pētījumu klāsts, kas saistīts ar cilvēka iegūtu holesteatomu. Tomēr pētījumi pārsvarā balstās uz klīniskās un/vai radioloģiskās ainas izvērtēšanu, bet mazāk tiek pētīta morfoloģija. Vēl mazāk ir salīdzinošo pētījumu, kur tiek izvērtēta pieaugušo un bērnu iegūta holesteatoma. No šiem salīdzinošiem pētījumiem tikai daži salīdzina šīs divas grupas morfoloģiskā aspektā. Līdz ar to eksistē dažādi viedokļi, vai un kā bērnu un pieaugušo iegūta holesteatoma atšķiras.

Holesteatomas patoģenēze nav pilnībā izskaidrota, tomēr zināms, ka tā saistās ar kaulaudu destrukciju, iekaisumu, izteiktu šūnu proliferāciju un augšanu. Mūsu pētījumā tika izvērtēti MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-4, Ki-67, NF- $\kappa$ B, IL-1 $\alpha$ , IL-10, H $\beta$ D-2, H $\beta$ D-4, VEGF un SHH bērnu, pieaugušo cilvēka iegūtas holesteatomas audos un arī kontroles audos, kas ir ārējās auss ejas āda. Izvēlētie audu marķieri saistās ar holesteatomas klīnisko gaitu. Jāuzsver, ka šis ir viens no plašākajiem pētījumiem pēc audu marķieru skaita, kas atspoguļo dažādus holesteatomas raksturojošos morfofunkcionālos procesus, un tas padara mūsu pētījumu par vienu no detalizētākajiem, kas pieejams zinātniskajā literatūrā, salīdzinot bērnu un pieaugušo audzēja grupas. Pētījumā arī apskatīti vairāki audu marķieri, kas iepriekš holesteatomas audos nav pētīti, piemēram, TIMP-4, H $\beta$ D-4 un SHH, līdz ar to šajos gadījumos nav iespējama iegūto rezultātu salīdzināšana ar citiem pētņiem. Tomēr tas lika ieskatīties citu patoloģiju pētījumos, lai varētu veikt piesardzīgus secinājumus par iegūtajiem rezultātiem. Visbeidzot, izpētot dažādos audu faktorus, mēs parādījām komplekso holesteatomas patoģenēzi, izvērtējot un izskaidrojot, kā arī ar citu pētījumu palīdzību pamatojot dažādās korelācijas starp audu faktoriem abu vecumu holesteatomas audos.

Rutīnās mikroskopijas paraugos abās holesteatomas grupās tika novērota epitēlija slāņa jeb matriksa šūnu hiperproliferācija, salīdzinot ar kontroles grupas

neizmainītu ārējās auss ejas ādas epitēliju. Holesteatomas matrikss bija līdzīgs neizmainītas ādas epitēlijam, ar tiem pašiem slāņiem (bazālais, dzeloņainais, graudainais un spīdošais), tomēr holesteatomas gadījumā tie bija hiperproliferēti. Šie novērojumi sakrīt arī ar citu autoru aprakstītajiem datiem (Lim and Saunders, 1972). Abu pacientu grupās redzamu atšķirību nebija. To var izskaidrot ar faktu, ka holesteatomas rašanās iemesli un mehānisms visu vecuma pacientiem ir līdzīgs (Louw, 2010).

Izvērtējot zemepitēlija saistaudus jeb perimatriksu, izteiktas atšķirības starp bērnu un pieaugušo pacientu grupām netika novērotas. Tomēr katras pacientu grupas ietvaros bija novērojamas individuālas atšķirības. Proti, dažiem pacientiem perimatrikss bija biežāks un izteikti infiltrētāks ar iekaisuma šūnām, tomēr citiem pacientiem perimatrikss bija plānāks un iekaisuma šūnu infiltrācija bija mazāka. Šāda aina bija vērojama gan bērnu, gan pieaugušo grupās. Līdzīgus novērojumus publicējuši arī citi autori (Dornelles et al., 2006). Salīdzinot holesteatomas perimatriksu ar kontroles ādas zemepitēlija saistaudiem, tika novērots, ka holesteatomas grupā saistaudi bija irdenāki un daudz vairāk infiltrēti ar iekaisuma šūnām, kā arī tika novērota izteikti lielāks mazo asinsvadu daudzums. Minētie dati liecina par kopēju audzēja ainu, kurā dominē iekaisums un neoangiogēnēze, kas veicina audzēja veidošanos, tomēr tās ir nespecifiskās pārmaiņas.

### **3.1. Audu remodelācija**

Cilvēka iegūtas holesteatomas gadījumā remodelācijas faktoru darbība ierosina apkārtējo kaulaudu destrukciju (Morales et al, 2007; Juhász et al., 2009). Izvērtējot **MMP-2** relatīvo daudzumu, netika novērota statistiski ticama atšķirība starp bērnu un pieaugušo holesteatomas grupām. Iegūtie dati atšķiras no vienīgā cita autora pētījuma datiem, kas salīdzina MMP-2 ekspresiju bērnu un pieaugušo pacientu grupās. *Dornelles* et al. savā pētījumā parāda, ka MMP-2 holesteatomas audos ir statistiski ticami vairāk ekspresēti bērnu holesteatomas grupā, salīdzinot

ar pieaugušajiem (Dornelles et al., 2009). Atšķirība starp pētījumiem ir tā, ka *Dornelles* et al. pētījumā skaitīšanas sistēma izmantoja tikai 4 vērtības (0–3), kas var radīt, iespējams, lielākas kļūdas iespēju statistiskajos aprēķinos. Tomēr šādu divu grupu salīdzinošo pētījumu skaits ir tik neliels, ka objektīva datu salīdzināšana starp pētījumiem ir apgrūtināta.

Salīdzinot MMP-2 ekspresiju abu holestatomas pacientu grupas ar kontroles grupas ārējās auss ejas ādu, tika novērtots, ka pacientu grupā MMP-2 relatīvais daudzums bija lielāks nekā kontroles grupā, tomēr netika novērotas statistiski ticamas atšķirības. Arī *Banerjee* et al. savā pētījumā novēroja līdzīgus rezultātus (Banerjee et al., 1998). Šos rezultātus palīdz izskaidrot *Morales* et al., kuri savā pētījumā parāda, ka klīniski agresīvajām holestatomām ir augstāka MMP-2 ekspresija, savukārt mazāk agresīvas holestatomas MMP-2 relatīvais daudzums būs tāds pats kā jebkuros citos bezpatoloģijas audos (Morales et al., 2007). Šā pētījuma autors neveica pacientu klīnisko datu korelāciju ar biomarkšiem, tomēr, izvērtējot katru pacientu individuāli, varēja redzēt, ka bija pacienti ar augstāku un pacienti ar zemāku MMP-2 ekspresiju audos un, ja izvērtētu klīnisko ainu, iespējams, tiktu atrastas MMP-2 ekspresijas korelācijas audzēja klīniskajai ainai. Tomēr šis ir perspektīvā pētījuma virziens.

**MMP-9** relatīvais daudzums bērnu un pieaugušo holestatomas audos bija līdzīgs un netika novērotas statistiski ticamas atšķirības starp šīm grupām. Līdzīgus datus iegūst arī *Palkó* et al., kuri savā pētījumā neatrod statistiski nozīmīgu atšķirību starp bērnu un pieaugušo grupām (Palkó et al., 2018), bet, izdalot pētāmās grupas sīkāk, tika novērots, ka pieaugušiem ar atkārtotu holestatomu MMP-9 rādītāji ir augstāki. Pretējus rezultātus ieguvusi *Dornelles* et al., kura savā pētījumā parāda, ka bērnu holestatomas gadījumā MMP-9 relatīvais daudzums ir lielāks, nekā pieaugušo holestatomas gadījumā (Dornelles et al., 2009). Jāuzsver, ka dažādos iegūtos rezultātus var ietekmēt pacientu atlase, – jo lielāks iekaisums audu analizēšanas laikā, jo iespējami

lielāka MMP-9 ekspresija audos. Turklāt *Juhász* et al. savā pētījumā parāda, ka antibakteriāla terapija var mazināt MMP-9 daudzumu audos (*Juhász* et al., 2009). Kā zināms, bērnu populācijā vidusauss iekaisumu biežums ir ievērojami lielāks nekā pieaugušo populācijā (*Al-Shehri* et al., 2021), kas var palīdzēt izskaidrot, kāpēc dažu autoru pētījumos bērnu grupā ir vērojama augstāka MMP-9 ekspresija holesteatomas audos, salīdzinot ar pieaugušo holesteatomu.

Salīdzinot abu grupu holesteatomas audus un kontroles grupas ādu un MMP-9 relatīvo daudzumu tajos, netika atrastas nozīmīgas atšķirības starp grupām. Tomēr kontroles grupā MMP-9 relatīvais daudzums bija nedaudz lielāks nekā abās holesteatomas grupās. Līdzīgus datus ieguvusi arī *Banerjee* et al., kurš savā pētījumā statistiski nozīmīgas atšķirības starp holesteatomu un kontroles ādu neatrod, tomēr holesteatomas grupā novēro nedaudz augstākus faktora rādītājus (*Banerjee* et al., 1998). Arī *Rezende* et al. savā pētījumā parāda, ka holesteatomas audos MMP-9 signālu ar PQR metodi neatrod (*Rezende* et al., 2012). Datus, ko iegūst *Rezende* et al., daļēji var attiecināt arī uz mūsu iegūtajiem rezultātiem, jo daudzos mikropreparātos MMP-9 bija ļoti vāji ekspresēts vai nebija nemaz atrodams. Savukārt pretējus rezultātus, kur MMP-9 ir statistiski nozīmīgi vairāk ekspresēts holesteatomas audos, salīdzinot ar kontroles grupu, ir ieguvuši vairāki autori (*Olszewska* et al., 2016; *Juhász* et al., 2009; *Suchozebrska-Jesionek* et al., 2008; *Kaya* et al., 2020). Šie autori arī korelē MMP-9 daudzumu ar klīnisko holesteatomas agresivitāti. Taču ir pētījumi, kuros tiek parādīts, ka samazināts MMP-9 daudzums pastiprina angiogēnēzi audzēja audos (*Pozzi* et al., 2002). Lai arī šis pētījums bija dzīvnieku modelī un nesaistās ar holesteatomu, tomēr tas var izskaidrot, ka ne tikai paaugstināts, bet arī samazināts MMP-9 līmenis var pastiprināt angiogēnēzi audzējā, tostarp, iespējams, holesteatomas audos.

**TIMP-2** relatīvais daudzums bērnu un pieaugušo holesteatomās bija līdzīgs, un netika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības starp šīm grupām.

Citu salīdzinošu pētījumu, kur izvērtēta TIMP-2 ekspresija bērnu un pieaugušo holesteatomā, mums pieejamajā zinātniskajā literatūrā atrast neizdevās. Ja salīdzina bērnu un pieaugušo holesteatomu ar kontroles grupu, tad novērojama tendence, ka bērnu grupā TIMP-2 novērojama mazāka ekspresija nekā kontroles audos, un atšķirība ir tuva statistiski nozīmīgai. Arī pieaugušo grupā TIMP-2 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums bija zemāks nekā kontroles grupā, tomēr atšķirība nebija tik izteikta kā bērniem. Līdzīgus datus, lai arī pētījumā ar citādu dizainu, kur tika pētīts gēnu daudzums, ieguva *Kaya et al.*, parādot, ka TIMP-2 holesteatomas audos bija samazināts, salīdzinot ar kontroles ādas audiem (*Kaya et al., 2020*).

**TIMP-4** relatīvais daudzums bērnu un pieaugušo holesteatomās bija līdzīgs, un netika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības starp grupām. Arī, salīdzinot abu pacientu grupas ar kontroles grupu, netika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības. Taču TIMP-4 ekspresija abu grupu holesteatomas audos bija lielāka nekā kontroles ādā. Pieejamajā zinātniskajā literatūrā pētījumi par TIMP-4 saistību ar holesteatomu nav atrodami. Tā kā TIMP-4 ir ievērojami vairāk ekspresēts holesteatomas audos nekā TIMP-2, varam secināt, ka neatkarīgi no pacienta vecuma tam ir nozīmīga loma holesteatomas patoģenēzē.

Izvērtējot mūsu iegūtos rezultātus par remodelācijas faktoriem, mēs novērojām, ka šo faktoru ekspresija holesteatomas audos ir variabla (MMP-2 ekspresijai bija palielināšanās tendence, MMP-9 bija tendence samazināties, TIMP-2 tendence bija samazināties, TIMP-4 tendence bija palielināties), salīdzinot ar kontroles grupu. Tas nozīmē, ka tik svarīgais līdzsvars starp MMP un TIMP holesteatomas audos ir izmainīts. Šo līdzsvara izmaiņu rezultātā pacientiem ar holesteatomu rodas audu remodelācija vidusausī. To pamato arī citi pētnieki, kuri izskaidro, ka disbalanss starp MMP un TIMP kompleksiem holesteatomas audos ierosina ECM proteolīzi, kas rada kaulaudu destrūkciju pacientiem ar holesteatomu (*Schönermark et al., 1996*). Šīs izmaiņas

novērojamas un ir līdzīgas neatkarīgi no pacienta vecuma, ko pierāda līdzīgie remodelācijas faktoru relatīvie daudzumi un līdzīgās savstarpējās korelācijas starp šiem audu marķieriem abu holesteatomas pacientu grupās. Šajā pētījumā novērojām ciešas pozitīvas korelācijas starp visiem remodelācijas faktoriem gan bērnu, gan pieaugušo holesteatomas grupās, kas norāda uz to, ka pastāv regulācija starp tiem.

### **3.2. Holesteatomas audu proliferācija**

Pastiprināta šūnu proliferācija ir viena no galvenajām holesteatomas raksturojošām pazīmēm (Yeşilova et al., 2017). Mēs izmantojam proliferācijas marķieri **Ki-67**, kas ir viens no uzticamākajiem marķieriem, kurš parāda šūnu dalīšanos, kā arī onkoloģijā tiek izmantots, lai noteiktu audzēja agresivitāti (Petrelli et al., 2015). Salīdzinot Ki-67 ekspresiju bērnu un pieaugušo holesteatomas audos, netika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības starp grupām. Zinātniskajā literatūrā atrodami pētījumi, kuru rezultāti arī parāda, ka Ki-67 relatīvais daudzums ir līdzīgs gan bērnu, gan pieaugušo holesteatomas audos (Sikka et al., 2012; Mallet et al., 2003). Taču eksistē dažādi viedokļi, piemēram, *Bujía* et al. savā pētījumā uzrāda, ka bērnu holesteatomas šūnu proliferācijas indekss ir lielāks nekā pieaugušajiem (*Bujía* et al., 1996). Atšķirības starp pētījuma rezultātiem, protams, var meklēt arī pētījuma dizainos, tomēr, mūsaprāt, svarīgāks ir aspekts, ko minējuši citi autori. Proti, ne visas holesteatomas būs “aktīvas”. *Mallet* et al. savā pētījumā holesteatomas iedalīja divās grupās – aktīvajās un neaktīvajās, kur aktīvajās Ki-67 pozitīvas šūnas būs vērojamas viscaur bazālajam slānim, bet neaktīvos audzējos Ki-67 pozitīvas šūnas bija neregulāri izkaisītas pa bazālo slāni (*Mallet* et al., 2003). Neaktīvās holesteatomas uzrāda mazāku proliferācijas indeksu. Tas attiecināms gan bērnu, gan pieaugušo grupām. Arī mūsu pētījumā bija šīs “aktīvās” un “neaktīvās” holesteatomas abās pacientu grupās. Tas atbilst tam, ko piemin *Bujía* et al. savā

pētījumā, proti, ka viena indivīda holesteatomas audi nevienādi ekspresē Ki-67 visos redzes laukos.

Mūsu iegūtie rezultāti parāda statistiski nozīmīgu palielinātu relatīvo Ki-67 pozitīvo šūnu daudzumu bērnu un pieaugušo holesteatomas audos, salīdzinot ar kontroles ārējās auss ejas ādu. Līdzīgus rezultātus iegūst arī citi pētnieki (Akdogan et al., 2013; Chung et al., 2015), proti, netika atrasti pētījumi, kuros rezultāti atšķirtos.

Izvērtējot mūsu iegūtos rezultātus, varam secināt, ka holesteatomas šūnu proliferācija nav atkarīga no pacienta vecuma. Mūsu pētījumā abas holesteatomas grupas bija homogēnas, kā arī abās grupās bija vērojamas līdzīgas individuālās izmaiņas starp pacientiem. Turklāt Ki-67 ir uzskatāms par ļoti ticamu proliferācijas marķieri, lai izvērtētu holesteatomas šūnu dalīšanās aktivitāti, un tas uzskatāmi parāda atšķirības starp salīdzināmajiem audiem. Ki-67 ir potenciāli nozīmīgs klīniskajā medicīnā, kur šo marķieri varētu izmantot, lai noteiktu, cik konkrētā pacienta holesteatomas audi spēj proliferēt, proti, izvērtēt šo audu proliferācijas indeksu, kas ļautu prognozēt iespējamo recidīva attīstības ātrumu. Pacientiem ar potenciāli augstāku holesteatomas proliferācijas indeksu atkārtota kontrole, magnētiskā rezonanse vai atkārtota operācija būtu plānojama ātrāk nekā pacientiem ar holesteatomu, kurai ir zems proliferācijas indekss.

### **3.3. Transkripcijas faktors**

**NF-κβ** ir nozīmīgs šūnu regulējošs faktors. Galvenokārt tas regulē iekaisuma procesus organismā, bet ir saistīts arī ar šūnu proliferāciju un apoptozes procesiem (Schürmann et al., 2022; Giuliani et al., 2018). Salīdzinot bērnu holesteatomas ar pieaugušo holesteatomas audiem un NF-κβ ekspresiju tajos, netika novērotas statistiski ticamas atšķirības starp šīm grupām. No iegūtajiem rezultātiem varam secināt, ka procesi, ko regulē NF-κβ, nav atkarīgi no pacienta vecuma. *Jesic* et al. savā pētījumā arī neatrod atšķirības starp NF-κβ



relatīvo daudzumu iegūtajos audos bērnu un pieaugušo hroniska vidusauss iekaisuma gadījumā (tai skaitā arī holesteatomas audos) (Jesic et al., 2014).

Ja salīdzina NF- $\kappa$ B ekspresiju bērnu un pieaugušo holesteatomas audos ar kontroles ādu, tika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības. NF- $\kappa$ B bija statistiski ticami vairāk ekspresēts gan bērnu holesteatomas, gan pieaugušo holesteatomas matriksā, salīdzinot ar kontroles ādas epitēliju. Līdzīgus rezultātus, kur holesteatomas epitēlijā tiek novērota palielināta NF- $\kappa$ B ekspresija, salīdzinot ar aizauss rajona ādu, pierāda arī citi autori (Byun et al., 2010; Xu et al., 2009; Du et al., 2016; Liu et al., 2014). *Byun* et al. arī izvirza pieņēmumu, ka aktivēts un palielināti izdalīts NF- $\kappa$ B ierobežo šūnu apoptozi, kā rezultātā rodas epitēlija šūnu hiperproliferācija, kas ir nozīmīga holesteatomas patoģenēzē (Byun et al., 2010). Arī *Liu* et al. savā pētījumā secina, ka palielinātais NF- $\kappa$ B kopā ar citiem šūnu faktoriem signālu ceļā ierosina holesteatomas šūnu hiperproliferāciju (Liu et al., 2014). Mūsu pētījumā tika novērotas ciešas un vidēji ciešas korelācijas bērnu un pieaugušo holesteatomas grupās starp NF- $\kappa$ B un Ki-67. Šie rezultāti līdzinās abu iepriekšminēto autoru secinājumiem par NF- $\kappa$ B iesaisti šūnu proliferācijas procesā holesteatomas gadījumā.

Mūsu pētījumā atradām ciešas korelācijas starp MMP-2, MMP-9 un NF- $\kappa$ B abu vecumu holesteatomas audos. Šos rezultātus var izskaidrot ar citu autoru pētījumiem, kur pierādīts, ka gan holesteatomā, gan citos audos NF- $\kappa$ B ir viens no MMP-2 un MMP-9 regulatoriem (Schürmann et al., 2022) un, aktivējot MMP darbību, tiek stimulēta audzēja augšana, īpaši angioģenēze (Shuman Moss et al., 2012). Mēs atradām arī vidēji ciešas un ciešas korelācijas starp NF- $\kappa$ B un VEGF abās pacientu grupās, kas liecina, ka NF- $\kappa$ B var ietekmēt angioģenēzi holesteatomas audos. Šos apgalvojumu apstiprina *Fukudome* et al., kuri savā pētījumā parāda, ka NF- $\kappa$ B ierosina VEGF aktivāciju (Fukudome et al., 2013). Zināms, ka VEGF, MMP-2 un MMP-9 savā starpā ir saistīti un gan veicina, gan kavē angioģenēzi dažādu audzēju audos (Zhu et al., 2019), un mūsu pētījumā

redzamās korelācijas starp šiem faktoriem liecina, ka arī holesteatomas audos angiogēnēzes un audu remodelācijas mehānismi ir līdzīgi un ka viens no šo mehānismu regulatoriem ir NF- $\kappa$ B. Svarīgi, ka mūsu pētījumā iegūtie rezultāti ir līdzīgi gan bērnu, gan pieaugušo grupās.

NF- $\kappa$ B galvenokārt tiek minēts saistībā ar iekaisuma regulēšanu. Ir zināms, ka IL-1 dažādos audos aktivē NF- $\kappa$ B. Aktivētais NF- $\kappa$ B tālāk veicina iekaisuma gēnu regulāciju un iekaisuma šūnu piesaisti (Guo et al., 2024). IL-10 savukārt caur signālu ceļiem vājina NF- $\kappa$ B aktivāciju, ierobežojot iekaisuma attīstību (Li et al., 2023). Eksperimentālā pētījumā tika pierādīts, ka pelēm, kurām inhibēta IL-10 darbība, paaugstinās NF- $\kappa$ B, radot iekaisumu (Saadane et al., 2005). Lai arī šādi pētījumi holesteatomas audos nav veikti, tomēr arī mūsu pētījumā konstatējām iekaisuma pārkumu un novērojam samazinātu IL-10 relatīvo daudzumu, salīdzinot ar kontroles audiem. Līdz ar to varam piesardzīgi minēt, ka IL-10 vājinātā darbība holesteatomas audos ietekmē to, ka NF- $\kappa$ B ir palielināts un tas pastiprina iekaisuma procesus. Šo teoriju pastiprina arī ciešās korelācijas starp IL-1, IL-10 un NF- $\kappa$ B gan bērnu, gan pieaugušo holesteatomas audos.

NF- $\kappa$ B ir iesaistīts ļoti dažādos procesos cilvēka organismā un slimību patoģenēzē (Giuliani et al., 2018), ko novērojam arī mūsu pētījumā. Proti, atklājām šī faktora iesaisti iekaisuma, šūnu proliferācijas, angiogēnēzes, audu remodelācijas un pretiekaisuma procesos, izskaidrojot korelācijas ar visiem šajā pētījumā apskatītajiem šūnu faktoriem. Tādējādi atkārtoti norādām uz NF- $\kappa$ B komplekso un svarīgo darbību arī holesteatomas patoģenēzē.

### **3.4. Iekaisumu veicinošie un nomācošie citokīni**

Netika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības ne IL-1 $\alpha$ , ne IL-10 relatīvajā daudzumā holesteatomas audos starp bērnu un pieaugušo grupām. Iegūtie rezultāti liecina, ka iekaisumu veicinošo un nomācošo citokīnu darbība un iekaisuma procesa regulācija, ko pamato arī ciešās un ļoti ciešās korelācijas

starp IL-1 $\alpha$  un IL-10 abu grupu holesteatomas audos, ir līdzīgas. Tomēr pieejamajā literatūrā trūkst salīdzinošu pētījumu par bērnu un pieaugušo grupām.

Arī salīdzinot bērnu un pieaugušo grupas ar kontroles grupu, netika novērotas statistiski ticamas atšķirības abu citokīnu relatīvajā daudzumā. **IL-1 $\alpha$**  daudzums holesteatomas audos bija lielāks nekā kontroles grupā, bet ne statistiski ticami. Citu autoru pētījumos IL-1 $\alpha$  daudzums holesteatomas audos bija statistiski ticami palielināts, salīdzinot ar kontroles grupu (Bujía et al., 1996; Yetiser et al., 2002; Kuczkowski et al., 2011; Çandar et al., 2022). Tomēr šie pētījumi veikti ar kvantitatīvajām IL-1 $\alpha$  noteikšanas metodēm *western blot* un ELISA. Mūsu rezultāti ir līdzīgi citu autoru iegūtajiem rezultātiem, jo atradām lielu iekaisuma šūnu infiltrāciju holesteatomas perimetriksā, lai arī no šīm iekaisuma šūnām tikai daļa izdalīja IL-1 $\alpha$ . Tā absolūtais daudzums bija lielāks, nekā kontroles ādā, liecinot par šī citokīna iesaisti iekaisuma uzturēšanā.

Aprakstīts, ka IL-1 $\alpha$  ierosina holesteatomas augšanu un kaulaudu destrukciju vidusausī pacientiem ar holesteatomu (Bujía et al., 1996; Lee et al., 2010). IL-1 $\alpha$  ierosina osteoklastu darbību un palielina kaula matricas degradāciju (Artano et al., 2020). Zināms, ka MMP-2 un MMP-9 arī ir tiešā veidā saistīti ar kaula matricas bojāšanu holesteatomas gadījumā (Morales et al., 2007; Juhász et al., 2009). Ir pierādīta IL-1 $\alpha$  loma kā MMP-2 un MMP-9 darbības ierosinātājam un sekojošai osteoklastu darbības ierosināšanai (Jia et al., 2021; Kusano et al., 1998). Šie pētījumi izskaidro arī mūsu iegūtos datus. Mūsu pētījumā redzējām korelācijas starp IL-1 $\alpha$  un MMP-2 un MMP-9. Pieņemam, ka holesteatomas audos IL-1 $\alpha$  ir nozīmīgs iekaisumu pastiprinošs faktors, kas var ietekmēt kaulaudu destrukciju pacientiem ar holesteatomu neatkarīgi no viņu vecuma, jo iegūtās korelācijas bija vērojamas gan bērnu, gan pieaugušo grupās.

Izvērtējot **IL-10** relatīvo daudzumu abās pacientu grupās un kontroles grupā, tika novērots, ka pacientu grupās tas ir mazāks nekā kontroles grupā, tomēr statistiski ticamas atšķirības starp grupām netika atklātas. Arī *Kuczkowski*

et al. savā pētījumā statistiski nozīmīgu atšķirību starp holesteatomas grupu un kontroles grupu neatklāja (Kuczkowski et al., 2011). Citos pētījumos autori piemin, ka samazināts IL-10 daudzums var izraisīt hronisku vidusauss iekaisumu un ka iekaisumu veicinošajiem un nomācošajiem faktoriem vajadzētu būt līdzsvarā (Juhn et al., 2008; Smirnova et al., 2004). Interesanti, ka mūsu pētījumā tika atrastas ciešas pozitīvas korelācijas starp IL-1 $\alpha$  un IL-10 abās pacientu grupās, taču kontroles grupā ļoti ciešas, bet negatīvas korelācijas. Šīs atšķirības varētu skaidrot, ka holesteatomas audos starp iekaisumu veicinošajiem un nomācošajiem citokīniem veidojas disregulācija, kā rezultātā veidojas hroniskais iekaisums, radot tālākas izmaiņas audos un audu faktoru darbībā, piemēram, kaulaudu destrukcijā. Šādu pieņēmumu izsaka *Kuczkowski et al.* (Kuczkowski et al., 2011).

IL-10 kā iekaisumu nomācošam citokīnam ir pierādīta MMP-9 inhibējoša darbība, bet tas aktivē TIMP-2 darbību (Mertz et al., 1994; Lee and Kim, 2014). Šī IL-10 funkcija nav pierādīta holesteatomas audos, tomēr, tā kā pētījumu ar IL-10 un tā lomu holesteatomas patoģenēzē ir maz, tad skaidrojumi jāmeklē citur. Mūsu pētījumā atradām ciešas pozitīvas korelācijas starp IL-10 un MMP-9, TIMP-2, TIMP-4 gan bērnu, gan pieaugušo holesteatomas audos. Šie rezultāti varētu liecināt, ka IL-10 ir iesaistīts MMP un TIMP regulācijā arī holesteatomas gadījumā. Tā kā ir zināms, ka IL-1 $\alpha$  regulē MMP darbību, mēs pieņemam, ka jau pierādītā disregulācija starp IL-1 $\alpha$  un IL-10 var ietekmēt arī līdzsvaru starp MMP un TIMP kompleksiem, kas, iespējams, rada kaulu remodelāciju pacientiem ar holesteatomu.

### **3.5. Cilvēka beta defensīni**

Cilvēka iegūto holesteatomu raksturo hronisks bakteriāls iekaisums. Viena no biežāk sastopamajām baktērijām hroniska vidusauss iekaisuma gadījumā ir *P. aeruginosa*, pret kuru H $\beta$ D-2 un H $\beta$ D-4 rada spēcīgu lokālu antibakteriālu iedarbību (Ricciardiello et al., 2009). Salīdzinot šo abu defensīnu

relatīvo daudzumu, bērnu un pieaugušo holesteatomas audos netika novērotas statistiski ticamas atšķirības starp grupām. Pieejamā zinātniskajā literatūrā līdzīgus salīdzinošus pētījumus neizdevās atrast. Pēc mūsu iegūtajiem rezultātiem varam secināt, ka lokālā audu faktoru antimikrobiālā darbība pacientiem ar holesteatomu nav atkarīga no pacienta vecuma.

Ja salīdzina **HβD-2** relatīvo daudzumu abu grupu pacientu holesteatomās un kontroles ādā, tika novērota statistiski nozīmīgi palielināta HβD-2 ekspresija holesteatomas perimatriksā. Arī epitēlija slānī holesteatomas gadījumā bija vērojams palielināts HβD-2 daudzums, tomēr tas nerasniedza statistiski ticamu daudzumu. Mūsu pētījuma dati sakrīt ar citu autoru rezultātiem, kur HβD-2 ir vairāk izdalīts holesteatomas grupā, salīdzinot ar kontroles audiem (Park et al., 2003; Ren et al., 2005; Song et al., 2007). Šos rezultātus pamato pētījumi, kur pierādīts, ka HβD-2 palielinātu ekspresiju audos ierosina citokīni un baktērijas (Meyer et al., 2000; Harder et al., 2000). Arī mūsu pētījumā atrodam līdzīgas ļoti ciešas un ciešas korelācijas bērnu un pieaugušo holesteatomas gadījumā starp HβD-2 un IL-1α, kā arī starp HβD-2 un NF-κβ un starp NF-κβ un IL-1α. Šī saistība starp iepriekš uzskaitītajiem faktoriem nav nejauša un ir parādīta arī citos pētījumos, kur IL-1α atklāts kā HβD-2 darbības ierosinātājs, bet NF-κβ ir šī procesa regulators (Moon et al., 2002; Wehkamp et al., 2006). Izvērtējot pretiekaisuma darbību holesteatomā, atradām līdzīgas korelācijas starp HβD-2 un IL-10 holesteatomas perimatriksā, kur ir daudz leukocītu gan bērnu, gan pieaugušo grupās, kas varētu nozīmēt, ka pretiekaisuma darbībā abi šie faktori palīdz viens otram. Mūsu iegūtos rezultātus palīdz izskaidrot Kanda et al., kuri pierāda, ka HβD-2 stimulē IL-10 darbību T šūnās (Kanda et al., 2011). No šiem rezultātiem varam secināt, ka HβD-2 ir nozīmīgs antimikrobiālais peptīds, kas iesaistīts iekaisuma veicinošā un nomācošā regulācijā, un tā darbība ir līdzīga visu vecumu pacientiem ar holesteatomu.

Interesantus rezultātus ieguvām, salīdzinot **HβD-4** daudzumu abu pacientu un kontroles grupās. Lai arī tendence HβD-4 daudzumam samazināties novērojama tikai bērnu holesteatomas matriksā, salīdzinot ar kontroles grupas epitēliju, tomēr arī pieaugušo grupā HβD-4 relatīvais daudzums bija mazāks nekā kontroles grupā. Pēc mums pieejamās informācijas, mūsu pētījums ir vienīgais, kur ir izvērtēts HβD-4 holesteatomas audos un veikta salīdzināšana starp dažādu vecumu pacientu grupām un kontroles audiem. Tika atrasts pētījums, kur hroniska periodontīta gadījumā HβD-4 daudzums gļotādā nebija atšķirīgs no veselajiem audiem (Li et al., 2016). Vēl citos pētījumos tika analizēts, ka tādi šūnu faktori kā IL-1, IL-6, INF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  nepalielina HβD-4 ekspresiju elpceļu epitēlijā, salīdzinot ar kontroles audiem, kā arī lipopolisaharīdu radītā ādas iekaisumā HβD-4 līmenis nepaaugstinās un ir līdzīgs kontroles audiem (Poiraud et al., 2012; García et al. 2001). Balstoties uz šiem datiem, tika izvirzīta teorija, ka HβD-4 nepiedalās šūnu ierosinātā imūnā reakcijā (Li et al., 2016). Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti pamato šo teoriju, jo gan bērnu, gan pieaugušo holesteatomas audos korelācijas starp HβD-4 un, piemēram, IL-1, IL-10, NF- $\kappa$ B vai remodelācijas faktoriem nebija, kā arī kopējās korelācijas starp faktoriem bija vien ļoti nelielā apjomā (salīdzinot ar HβD-2).

Lai arī pētījumi par cilvēka beta defensīnu darbību holesteatomas audos ir ļoti maz, tomēr, izskatot visus pētījumus, var secināt, ka no pētītajiem cilvēka beta defensīniem tieši HβD-2 ir visaktīvāk ekspresētais holesteatomas audos. Tā, piemēram, *Song et al.* parāda HβD-2 lielāku aktivitāti holesteatomas audos, nekā tāda ir HβD-3, un *Park et al.* parāda, ka HβD-2 ir aktīvāks par HβD-1 (*Song et al., 2007; Park et al., 2003*). Visbeidzot, mūsu pētījumā iegūtie rezultāti pārliecinoši parāda, ka HβD-2 ir vairāk izdalīts abu vecumu holesteatomas audos, ja salīdzina ar HβD-4. Secinām, ka HβD-2 ir nozīmīgāks antimikrobiālais peptīds holesteatomas gadījumā nekā HβD-4, un to pamato ievērojami lielāks korelāciju daudzums starp HβD-2 un citiem audu faktoriem gan bērnu, gan pieaugušo holesteatomas gadījumā.

### 3.6. Vaskulārais endoteliālais augšanas faktors

Angioģenēze ir svarīga, lai holesteatoma varētu augt un izplatīties vidusausī (Hamed et al., 2019). Salīdzinot bērnu grupu ar pieaugušo grupu, netika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības VEGF ekspresijā. Līdz ar to varam secināt, ka angioģenēze bērnu un pieaugušo holesteatomas audos ir līdzīga un nav vecuma atkarīga.

Salīdzinot kontroles grupu ar abu pacientu grupām, statistiski nozīmīgas atšķirības nebija vērojamas. Tomēr tika novērota tendence, ka ārējās auss ejas ādas epitēlijā VEGF relatīvais daudzums bija lielāks, nekā pieaugušo pacientu holesteatomas matriksā. Bērniem šādas tendences nebija, taču VEGF pozitīvo šūnu daudzums bija mazāks nekā kontroles grupā. Šie rezultāti atšķiras no citu autoru pētījumiem, piemēram, Zang et al. savā pētījumā parāda, ka VEGF holesteatomas matriksā ir vairāk, nekā ādas epitēlijā (Zang et al., 2019). Rezultātu atšķirību varētu noteikt fakts, ka Zang et al. savā pētījumā izmantoja *western blot* metodi VEGF noteikšanai, kas parāda atšķirīgus no mūsu iegūtajiem faktora koncentrācijas rezultātus. Jāpiemin, ka mūsu iegūtos rezultātus varētu izskaidrot ar citu audzēju pētījumiem. Šeit jāmin bazālo šūnu karcinoma, kur epitēlija slānī VEGF daudzums ir samazināts, kā arī VEGF dažādu citu epitēliālu audzēju gadījumā tiek sekretēts ekstracelulārajā telpā. Zināms, ka VEGF tiek sekretēts parakrīni arī holesteatomas gadījumā, kur keratinocīti izdala VEGF, kas nonāk perimatriksā un ierosina angioģenēzi (Fukudome et al., 2013). Tas varētu izskaidrot, kāpēc mūsu pētījumā VEGF pozitīvo šūnu daudzums matriksā ir mazāk nekā kontroles ādas epitēlijā. Šo apstiprina arī mūsu pētījumā iegūtās ciešās korelācijas starp VEGF matriksā un VEGF perimatriksā abu vecumu grupu pacientu holesteatomas audos.

Ja salīdzina mūsu pētījumā aktuālo VEGF relatīvo daudzumu holesteatomas perimatriksā un kontroles zemādas saistaudos, arī šeit nevērojām statistiski nozīmīgas atšķirības starp grupām. Tomēr citos pētījumos rezultāti

parāda VEGF izdales palielinājumu, salīdzinot ar kontroles grupu. Tā, piemēram, *Fukudome et al.* savā pētījumā parāda VEGF palielināto daudzumu perimatriksā, salīdzinot ar kontroles audiem (*Fukudome et al.*, 2013). Šajā gadījumā pacientu skaits bija neliels, kas varētu ietekmēt rezultātus. *Sudhoff et al.* savā pētījumā parāda, ka asinsvadu daudzums un VEGF ekspresija holesteatomas gadījumā ir lielāka, nekā kontroles ādā (*Sudhoff et al.*, 2000). Šīs atšķirības starp pētījumiem varam izskaidrot ar faktu, ka mūsu pētījumā perimatriksā skatījāmies tikai endoteliocītus. Asinsvadu daudzums, ja salīdzina ar kontroles grupas zemādu, holesteatomas gadījumā bija ievērojami lielāks, tomēr ne visi endoteliocīti šajos asinsvados izdalīja VEGF un tā relatīvais daudzums nebija lielāks, nekā kontroles zemādas pozitīvo endoteliocītu relatīvais daudzums. Pētot absolūto asinsvadu un VEGF pozitīvo šūnu daudzumu, iespējams, rezultāti ar citu autoru iegūtajiem datiem būtu līdzīgi. Tomēr savā pētījumā pieturējamies pie vienas izvērtēšanas sistēmas visiem marķieriem. Būtiski, ka neoangiogēnēze holesteatomas gadījumā ir ievērojami izteiktāka holesteatomas audos, salīdzinot ar kontroles ādu (*Olszewska et al.*, 2004).

Korelācijas starp VEGF un MMP-2, MMP-9 un NF- $\kappa$ B norāda uz šī šūnu faktora nozīmi dažādos holesteatomas procesos kā audu remodelācija un angiogēnēze (*Fukudome et al.*, 2013; *Zhu et al.*, 2019).

### **3.7. *Sonic hedgehog* gēna proteīns**

**SHH gēna proteīna** relatīvais daudzums bērnu un pieaugušo holesteatomas audos bija līdzīgs un nesasniedza statistiski nozīmīgas atšķirības. Šis ir pirmais pētījums, kas izvērtē šī gēna proteīna daudzumu holesteatomas audos, un pirmo reizi tika veikta faktora atrades salīdzināšana starp dažāda vecuma pacientu grupām.

Salīdzinot SHH gēna proteīnu abās holesteatomas grupās un kontroles grupas ādā, ieguvām statistiski nozīmīgu palielinātu SHH relatīvo daudzumu abu



grupu holesteatomas perimatriksā. Holesteatomas matriksā SHH relatīvais daudzums, salīdzinot ar ādas epitēliju, nerasniedza statistiski nozīmīgas atšķirības.

SHH gēns saistīts arī ar auss attīstību, tā, piemēram, SHH zudums ietekmē ārējās un vidusauss attīstību (Rees and Gillis, 2022; Grevellec et al., 2011). Pierādīts, ka SHH palielināts daudzums ir gan ļaundabīgos audzējos, gan arī priekšvēža stāvokļos mutes dobumā (Gonzalez et al., 2016; Takabatake et al., 2019). Arī citās orgānu sistēmās SHH daudzums audzēju šūnās ir palielināts, salīdzinot ar kontroles audiem, kā arī pierādīts, ka tas ir saistīts ar audzēja augšanu (Jing et al., 2023). Zināms, ka perimatrikss holesteatomas gadījumā ir nozīmīgs holesteatomas agresivitātei un augšanai, tajā atrodas daudz iekaisuma šūnu, kā arī šis ir holesteatomas slānis, kas ir tiešā kontaktā ar apkārtējiem veseliem audiem (Dornelles et al., 2006). *Dornelles et al.* savā pētījumā korelēja perimatriksa biezumu ar holesteatomas agresivitāti, – jo biezāks perimatrikss, jo lielāka iekaisumu šūnu infiltrācija un lielāka audzēja agresivitāte apkārtējiem audiem.

Novērojumi par perimatriksa nozīmi holesteatomas agresivitātē, kā arī pētījumi par SHH saistību ar audzēju augšanu un fakts, ka SHH ir palielināts gan ļaundabīgos, gan labdabīgos agresīvos veidojumos, piemēram, priekšvēža stāvokļos mutes dobumā un arī holesteatomas gadījumā, norāda, ka SHH ir nozīmīga loma holesteatomas patoģenēzē. Pieļaujam, ka SHH ietekmē perimatriksa augšanu, tādējādi pastiprinot arī pašas holesteatomas augšanu un tās destruktīvo ietekmi uz vidusauss apkārtējiem audiem. Svarīgi, ka šie procesi ir līdzīgi gan bērnu, gan pieaugušo holesteatomas audos.

Apkopojot mūsu iegūtos rezultātus, varam secināt, ka šī darba izvirzītā hipotēze neapstiprinās, proti, netika atrastas atšķirības starp audu remodelāciju, proliferāciju, iekaisuma veicinošo un nomācošo darbību, kā arī regulāciju, audu vietējo aizsardzību, angiogēnēzi un *Sonic hedgehog* gēna proteīna ekspresiju holesteatomas audos **dažāda vecuma pacientiem. Tika uzskatāmi pierādīts, ka morfoloģiskā aina gan bērnu, gan pieaugušo holesteatomas audos ir**

**līdzīga un dažādu audu faktoru izdale ir vairāk līdzīga nekā atšķirīga.** To pierāda līdzīgie audu marķieru relatīvie daudzumi, līdzīgās korelācijas starp audu faktoriem, kā arī to līdzīgās variācijas holesteatomas audos abās vecumgrupās. Secinājumus, ka bērnu un pieaugušo holesteatomas audi morfoloģiski nav atšķirīgi, ieguvuši arī citi pētnieki (Sikka et al., 2012; Welkoborsky et al., 2007; Dornelles et al., 2006). Tomēr eksistē arī atšķirīgi viedokļi, kad pētījumos atklātas atšķirības starp bērnu un pieaugušo grupām dažādiem audu marķieriem, secinot, ka bērnu holesteatoma ir agresīvāka nekā pieaugušo (Bujía et al., 1996; Dornelles et al., 2009). Nav noliedzams, ka bērniem šī slimība norit agresīvāk un ka ir biežāks recidīvu skaits, ko parāda arī daudzie klīniskie (salīdzinot ar mazo morfoloģisko pētījumu skaitu) un radioloģiskie pētījumi (Jackson et al., 2018; Kalia et al., 2022; Lima et al., 2020; Lynrah et al., 2013). Tomēr mēs morfoloģiskas atšķirības starp šīm grupām neatradām. Klīnisko slimības gaitu starp bērnu un pieaugušo grupām var ietekmēt tādas atšķirības, kā daudz biežākas augšējo elpceļu sasilšanas un vidusauss iekaisumi bērniem, atšķirības aizauss pagura pneimatizācijā un šūnu attīstībā, Eistahija kanāla anatomiskās atšķirības, kā arī hormonālās darbības variācijas (Preciado et al., 2012).

Salīdzinot abas pētāmās pacientu grupas, apzināmies, ka bērni (īpaši vecākie) fizioloģiski līdzinās pieaugušajiem (īpaši jaunākajiem) un, protams, korektāks būtu iedalījums pēc ādas nobriešanas, kas tāda kļūst apmēram septiņu gadu vecumā, taču mēs vadījāmies pēc valstī pieņemtās vecuma iedalījuma skalas.

Pētījumam ir arī savi ierobežojumi. Lai arī IHĶ un puskvantitatīvā audu izvērtēšanas metode ir precīza un plaši lietota pētniecībā, tomēr ar šīm metodēm nevaram noteikt marķieru koncentrācijas pētāmos audos, kas ļautu precīzāk salīdzināt grupas, īpaši pētāmās grupas ar kontroles grupu. Tādas metodes kā ELISA un *Western blot* būtu noderīgas vēl precīzāku rezultātu noteikšanai. Kā vēl viens ierobežojums jāmin relatīvi mazais kontroles grupas pacientu skaits,

kā arī tas, ka audi ņemti no mirušu cilvēku ķermeņiem, tomēr ētiskie apstākļi nosaka tieši šīs grupas materiāla izvēli.

## Secinājumi

1. Holesteatomas matriksa hiperproliferācija, variablais perimatrikss un neoangioģenēze ar iekaisuma šūnu infiltrāciju ir ar vecumu nesaistītas holesteatomas nespecifiskās audu pārmaiņas.
2. Variablā remodelācijas faktoru ekspresija (MMP-2 un īpaši TIMP-4 pozitīvo struktūru palielināšanās tendence, bet MMP-9 un TIMP-2 samazināšanās tendence) holesteatomas audos norāda ar vecumu nesaistītu remodelācijas faktoru disbalansu ar specifisku, galvenokārt kompensatoru, TIMP-4 iesaisti.
3. Statistiski ticami palielinātais Ki-67 holesteatomas šūnu daudzums norāda audzēja agresivitāti, kas gan ir variabla pat viena veidojuma ietvaros un nekorelē ar vecumu.
4. NF- $\kappa$ B izteiktā atrade holesteatomas epitēlijā un ciešās korelācijas ar Ki-67, IL-1 $\alpha$ , IL-10, MMPs un VEGF norāda uz iekaisuma modelētu epitēlija proliferāciju, saglabātu balansu starp iekaisuma veicinošajiem un nomācošajiem citokīniem, aktīvu remodelāciju išēmijas stimulētas neoangioģenēzes apstākļos longitūdinālā aspektā.
5. IL-1 $\alpha$  pozitīvo struktūru skaita palielināšanās tendence un IL-10 pozitīvo šūnu skaita samazināšanās tendence holesteatomas audos norāda uz nelielu audzējam raksturīgu kopējo iekaisuma veicinošo un nomācošo citokīnu disbalansu.
6. Statistiski ticami palielinātais H $\beta$ D-2 pozitīvo šūnu daudzums holesteatomas perimatriksā un tā palielināšanās tendence epitēlijā līdztekus ciešai korelācijai ar IL-10 norāda kopēju no vecuma neatkarīgu lokālās audu aizsardzības faktoru intensifikāciju.
7. SHH pozitīvo šūnu statistiski ticami palielinātais daudzums holesteatomas perimatriksā norāda šī gēna proteīna intensifikāciju audzēja augšanā, lai gan ar vēl neskaidru morfopatoģenētisko iesaistes ceļu.

8. Bērnu un pieaugušo holesteatomas audos, bez nelielām individuālām variācijām, **praktiski neatšķiras audu remodelācijas, šūnu proliferācijas, iekaisuma veicinošo un nomācošo citokīnu un antimikrobo aizsardzības proteīnu izdala, angiogēnēzes procesi un SHH gēna proteīna stimulācija.**

## Priekšlikumi

Cilvēka iegūta holesteatoma norit ar relatīvi agresīvu gaitu. Būtu nepieciešams vairāk pētījumu, kas izvērtē **slimības klīniskās gaitas un deniņu kaula individuālās anatomijas korelāciju ar dažādiem audu marķieriem**. Šādi pētījumi varētu palīdzēt labāk definēt audu marķierus, kurus varētu izmantot ikdienas praksē, tas palīdzētu labāk izprast un prognozēt slimības norisi konkrētam pacientam, kā arī nodrošinātu labāku slimības kontroli jau pēc operācijas.

Šobrīd strauji attīstās gēnu pētījumi, kas paver iespējas **izvērtēt dažādu gēnu iesaisti** arī holesteatomas attīstībā.

Visbeidzot, holesteatomas vienīgā ārstēšanas iespēja ir ķirurģiska tās ekscīzija, tomēr būtu nepieciešams **veikt tālākus pētījumus dažādu lokālu vai sistēmisku medikamentu izstrādē**, kas varētu samazināt holesteatomas recidīvu biežumu.

## Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu

### Publikācijas (*Scopus, Web of Science, ERIH PLUS*):

1. **Damberg, K.,** Sumeraga, G., Pilmane, M. 2024. Comparison of Tissue Factors in the Ontogenetic Aspects of Human Cholesteatoma. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 14(6), 662. doi:10.3390/diagnostics14060662
2. **Damberg, K.,** Sumeraga, G., Pilmane, M. 2023. Morphopathogenesis of Adult Acquired Cholesteatoma. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 59(2), 306. doi:10.3390/medicina59020306
3. **Damberg, K.,** Sumeraga, G., Pilmane, M. 2022. Remodeling Factors, Transcription Factors and Angiogenetic Factors in Cholesteatoma in Ontogenetic Aspect. *Iranian journal of otorhinolaryngology*, 34(121), 71–81. doi:10.22038/IJORL.2021.53716.2842
4. **Damberg, K.,** Sumeraga, G., Pilmane, M. 2021. Complex Evaluation of Tissue Factors in Pediatric Cholesteatoma. *Children (Basel, Switzerland)*, 8(10), 926. doi:10.3390/children8100926

### Ziņojumi un tēzes:

1. **Damberg, K.,** Sumeraga, G., Pilmane, M. 2024. Morphological comparison of paediatric and adult acquired cholesteatoma. 11<sup>th</sup> Baltic Morphology Meeting. Riga, Latvia. Abstracts, 13.–15.11.2024., 25 (Mutiska prezentācija).
2. **Damberg, K.,** Sumeraga, G., Pilmane, M. 2024. Comparison of Adult and Children Acquired Cholesteatoma. 7th Congress of European ORL-HNS. Dublin, Ireland. 15.–19.06.2024. (Mutiska prezentācija).
3. **Damberg, K.,** Sumeraga, G., Pilmane, M. 2023. Morphological differences between an adult and paediatric acquired cholesteatoma. 8th Baltic ENT congress. Vilnius, Lithuania. 09.–10.06.2023. (Mutiska prezentācija).
4. **Damberg, K.,** Sumeraga, G., Pilmane, M. 2023. Comparison of proliferation and remodeling markers in adult and paediatric cholesteatoma. 16th Congress of the European Society of Pediatric Otorhinolaryngology. Liverpool, United Kingdom. 20.–23.05.2023. (Mutiska prezentācija).
5. **Damberg, K.,** Sumeraga, G., Pilmane, M. 2023. Morphological Characterisation of Paediatric and Adult Acquired Cholesteatoma. Rīga Stradiņš University International Research Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice” 29.–31.03.2023. (Mutiska prezentācija).
6. **Damberg, K.,** Sumeraga, G., Pilmane, M. 2023. Immunohistochemical comparison of adult and children cholesteatoma. International Practical Ophthalmology. Medical and Environmental Problems of our Days: Collection of Works International Scientific and Practical Interdisciplinary Conference. State Institution “National

Research Center for Radiation medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”. Abstracts, 23.–24.02.2023., 31–33 (Mutiska prezentācija).

7. **Damberg, K.**, Sumeraga, G., Pilmane, M. 2021. Transcription and remodelling factors in the development of cholesteatoma from an ontogenetic aspect compared to deep external ear skin controls. Rīga Stradiņš University International Research Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice”. Abstracts, 24.–26.03.2021., 430 (Stenda referāts).
8. **Damberg, K.**, Sumeraga, G., Pilmane, M. 2021. Proliferation markers, remodelling factors and antimicrobial peptides in cholesteatoma. The 15th Congress of the European Society of Pediatric Otorhinolaryngology. Marseille, France. 13.–16.02.2021. (Stenda referāts).



## Literatūras un avotu saraksts

1. Akdogan, V., Yilmaz, I., Canpolat, T. and Ozluoglu, L. N. 2013. Role of Langerhans cells, Ki-67 protein and apoptosis in acquired cholesteatoma: prospective clinical study. *The Journal of laryngology and otology*, 127(3), 252–259.
2. Al-Shehri, A. M., Sr, Al-Zomia, A. S., Alayash, A. F., M Al Hunaif, A., A Mansour, A., Alqahtani, M., A Asiri, O. and A Alserhan, S. 2021. Association Between Acute Otitis Media and Inner Ear Disorders Among Adults in Aseer Region. *Cureus*, 13(11), e19556.
3. Artono, Surarto, B., Purnami, N., Hutahaen, F. and Mahardhika, M. R. 2020. The Association of IL-1 Alpha Level and TNF Alpha Expressions on Bone Destruction in Chronic Suppurative Otitis Media and Cholesteatoma. *Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery : official publication of the Association of Otolaryngologists of India*, 72(1), 1–7.
4. Banerjee, A. R., James, R. and Narula, A. A. 1998. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in cholesteatoma and deep meatal skin. *Clinical otolaryngology and allied sciences*, 23(4), 345–347.
5. Barton, B. and Peat, J. K. 2014. *Medical statistics: a guide to SPSS, data analysis and critical appraisal / Belinda Barton, Jennifer Peat*. Chester, West Sussex; Hoboken, NJ: Wiley Blackwell/ BMJ Books. Iegūts no: via GoogleBooks [skatīts: 15.03.2024]
6. Bhutta, M. F., Williamson, I. G. and Sudhoff, H. H. 2011. Cholesteatoma. *BMJ (Clinical research ed.)*, 342, d1088.
7. Byun, J. Y., Yune, T. Y., Lee, J. Y., Yeo, S. G. and Park, M. S. 2010. Expression of CYLD and NF-kappaB in human cholesteatoma epithelium. *Mediators of inflammation*, 2010, 796315.
8. Britze, A., Møller, M. L. and Ovesen, T. 2017. Incidence, 10-year recidivism rate and prognostic factors for cholesteatoma. *The Journal of laryngology and otology*, 131(4), 319–328.
9. Bujía, J., Holly, A., Antolí-Candela, F., Tapia, M. G. and Kastenbauer, E. 1996. Immunobiological peculiarities of cholesteatoma in children: quantification of epithelial proliferation by MIB1. *The Laryngoscope*, 106(7), 865–868.
10. Bujía, J., Kim, C., Ostos, P., Sudhoff, H., Kastenbauer, E. and Hültner, L. 1996. Interleukin 1 (IL-1) and IL-1-receptor antagonist (IL-1-RA) in middle ear cholesteatoma: an analysis of protein production and biological activity. *European archives of oto-rhino-laryngology*, 253(4-5), 252–255.
11. Çandar, T., Baklaci, D., Bilgin, E., Erdem, D. and Dalgıç, M. 2022. Investigation of EGF, IL1- $\alpha$  and IL-6 levels and selected hematological parameters (NLR, MPV) in patients with the chronic cholesteatomatous otitis media. *Acta biochimica Polonica*, 69(3), 633–637.

12. Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H. and Beachy, P. A. 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking *Sonic hedgehog* gene function. *Nature*, 383(6599), 407–413.
13. Chung, J. H., Lee, S. H., Park, C. W., Kim, K. R., Tae, K., Kang, S. H., Oh, Y. H. and Pyo, J. Y. 2015. Expression of Apoptotic vs Antiapoptotic Proteins in Middle Ear Cholesteatoma. *Otolaryngology--head and neck surgery*, 153(6), 1024–1030.
14. Dornelles, C., Meurer, L., Selaimen da Costa, S. and Schweiger, C. 2006. Histologic description of acquired cholesteatomas: comparison between children and adults. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 72(5), 641–648.
15. Dornelles, C.deC., da Costa, S. S., Meurer, L., Rosito, L. P., da Silva, A. R. and Alves, S. L. 2009. Comparison of acquired cholesteatoma between pediatric and adult patients. *European archives of oto-rhino-laryngology*, 266(10), 1553–1561.
16. Du, L., Xie, Y. D. and Liu, M. 2016. Expression and significance of PDK1 and NF- $\kappa$ B in the middle ear cholesteatoma. *Journal of clinical otorhinolaryngology, head, and neck surgery*, 30(10), 770–773.
17. Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J. and Zeller, R. 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH protocols*, 2008, pdb.prot4986.
18. Fontes Lima, A., Carvalho Moreira, F., Sousa Menezes, A., Esteves Costa, I., Azevedo, C., Sá Breda, M. and Dias, L. 2020. Is pediatric cholesteatoma more aggressive in children than in adults? A comparative study using the EAONO/JOS classification. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 138, 110170.
19. Forthofer, R., Lee, E. S. and Hernandez, M. (Eds.). 2007. Descriptive methods. In: Forthofer, R., Lee, E. S. and Hernandez, M., ed. *Biostatistics (Second Edition)*. Academic Press, 21–69. Iegūts no doi.org/10.1016/B978-0-12-369492-8.50008-X. [skatīts 15.03.2024]
20. Fukudome, S., Wang, C., Hamajima, Y., Ye, S., Zheng, Y., Narita, N., Sunaga, H., Fujieda, S., Hu, X., Feng, L. and Lin, J. 2013. Regulation of the angiogenesis of acquired middle ear cholesteatomas by inhibitor of DNA binding transcription factor. *JAMA otolaryngology-- head & neck surgery*, 139(3), 273–278.
21. García, J. R., Krause, A., Schulz, S., Rodríguez-Jiménez, F. J., Klüver, E., Adermann, K., Forssmann, U., Frimpong-Boateng, A., Bals, R. and Forssmann, W. G. 2001. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB journal*, 15(10), 1819–1821.
22. Giuliani, C., Bucci, I. and Napolitano, G. 2018. The Role of the Transcription Factor Nuclear Factor-kappa B in Thyroid Autoimmunity and Cancer. *Frontiers in endocrinology*, 9, 471.
23. Givvimani, S., Tyagi, N., Sen, U., Mishra, P. K., Qipshidze, N., Munjal, C., Vacek, J. C., Abe, O. A. and Tyagi, S. C. 2010. MMP-2/TIMP-2/TIMP-4 versus MMP-9/TIMP-3 in transition from compensatory hypertrophy and angiogenesis to decompensatory heart failure. *Archives of physiology and biochemistry*, 116(2), 63–72.

24. Gonzalez, A. C., Ferreira, M., Ariel, T., Reis, S. R., Andrade, Z. and Peixoto Medrado, A. 2016. Immunohistochemical evaluation of hedgehog signalling in epithelial/mesenchymal interactions in squamous cell carcinoma transformation: a pilot study. *Journal of oral pathology & medicine*, 45(3), 173–179.
25. Grevellec, A., Graham, A. and Tucker, A. S. 2011. Shh signalling restricts the expression of Gcm2 and controls the position of the developing parathyroids. *Developmental biology*, 353(2), 194–205.
26. Guo, Q., Jin, Y., Chen, X., Ye, X., Shen, X., Lin, M., Zeng, C., Zhou, T. and Zhang, J. 2024. NF- $\kappa$ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. *Signal transduction and targeted therapy*, 9(1), 53.
27. Hamed, M. A., Sayed, R. H., Shiogama, K., Eltaher, M. A., Suzuki, K. and Nakata, S. 2019. Localisation of basic fibroblast growth factor in cholesteatoma matrix: an immunochemical study. *The Journal of laryngology and otology*, 133(3), 183–186.
28. Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. and Schröder, J. M. 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387(6636), 861.
29. Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L. M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S. and Schröder, J. M. 2000. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 22(6), 714–721.
30. Jackson, R., Addison, A. B. and Prinsley, P. R. 2018. Cholesteatoma in children and adults: are there really any differences? *The Journal of laryngology and otology*, 132(7), 575–578.
31. Jesic, S., Jotic, A., Tomanovic, N. and Zivkovic, M. 2014. Expression of toll-like receptors 2, 4 and nuclear factor kappa B in mucosal lesions of human otitis: pattern and relationship in a clinical immunohistochemical study. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 123(6), 434–441.
32. Jia, Y., Chen, X. and Sun, J. 2021. Apremilast ameliorates IL-1 $\alpha$ -induced dysfunction in epidermal stem cells. *Aging*, 13(15), 19293–19305.
33. Jing, J., Wu, Z., Wang, J., Luo, G., Lin, H., Fan, Y. and Zhou, C. 2023. Hedgehog signaling in tissue homeostasis, cancers, and targeted therapies. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 315.
34. Juhász, A., Sziklai, I., Rákósy, Z., Ecsedi, S., Adány, R. and Balázs, M. 2009. Elevated level of tenascin and matrix metalloproteinase 9 correlates with the bone destruction capacity of cholesteatomas. *Otology & neurotology*, 30(4), 559–565.
35. Juhn, S. K., Jung, M. K., Hoffman, M. D., Drew, B. R., Preciado, D. A., Sausen, N. J., Jung, T. T., Kim, B. H., Park, S. Y., Lin, J., Ondrey, F. G., Mains, D. R. and Huang, T. 2008. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of otitis media and sequelae. *Clinical and experimental otorhinolaryngology*, 1(3), 117–138.

36. Kaya, İ., Avcı, Ç. B., Şahin, F. F., Özateş, N. P., Sezgin, B., Kurt, C. Ç., Bilgen, C. and Kirazlı, T. 2020. Evaluation of significant gene expression changes in congenital and acquired cholesteatoma. *Molecular biology reports*, 47(8), 6127–6133.
37. Kalia, M., Dass, A., Singhal, S. K. and Gupta, N. 2022. Comparative study of cholesteatoma in paediatric and adult patients. *The Journal of laryngology and otology*, 136(8), 765–768.
38. Kanda, N., Kamata, M., Tada, Y., Ishikawa, T., Sato, S. and Watanabe, S. 2011. Human  $\beta$ -defensin-2 enhances IFN- $\gamma$  and IL-10 production and suppresses IL-17 production in T cells. *Journal of leukocyte biology*, 89(6), 935–944.
39. Kuczkowski, J., Sakowicz-Burkiewicz, M., Iżycka-Świeszewska, E., Mikaszewski, B. and Pawełczyk, T. 2011. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-6 and interleukin-10 in chronic otitis media with bone osteolysis. *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties*, 73(2), 93–99.
40. Kuo, C. L., Shiao, A. S., Yung, M., Sakagami, M., Sudhoff, H., Wang, C. H., Hsu, C. H. and Lien, C. F. 2015. Updates and knowledge gaps in cholesteatoma research. *BioMed research international*, 2015, 854024.
41. Kusano, K., Miyaura, C., Inada, M., Tamura, T., Ito, A., Nagase, H., Kamoi, K. and Suda, T. 1998. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology*, 139(3), 1338–1345.
42. Lee, E. J. and Kim, H. S. 2014. The anti-inflammatory role of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in lipopolysaccharide-stimulated microglia. *Journal of neuroinflammation*, 11, 116.
43. Lee, Y. M., Fujikado, N., Manaka, H., Yasuda, H. and Iwakura, Y. 2010. IL-1 plays an important role in the bone metabolism under physiological conditions. *International immunology*, 22(10), 805–816.
44. Li, K., Li, J., Wei, X., Wang, J., Geng, M., Ai, K., Liang, W., Zhang, J., Li, K., Gao, H. and Yang, J. 2023. IL-10 Negatively Controls the Primary T Cell Response of Tilapia by Triggering the JAK1/STAT3/SOCS3 Axis That Suppresses NF- $\kappa$ B and MAPK/ERK Signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 210(3), 229–244.
45. Li, X., Duan, D., Yang, J., Wang, P., Han, B., Zhao, L., Jepsen, S., Dommisch, H., Winter, J. and Xu, Y. 2016. The expression of human  $\beta$ -defensins (hBD-1, hBD-2, hBD-3, hBD-4) in gingival epithelia. *Archives of oral biology*, 66, 15–21.
46. Lillie, R. D., Pizzolato, P. and Donaldson, P. T. 1976. Hematoxylin substitutes: a survey of mordant dyes tested and consideration of the relation of their structure to performance as nuclear stains. *Stain technology*, 51(1), 25–41.
47. Lim, D. J. and Saunders, W. H. 1972. Acquired cholesteatoma: light and electron microscopic observations. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 81(1), 1–11.

48. Liu, W., Yin, T., Ren, J., Li, L., Xiao, Z., Chen, X. and Xie, D. 2014. Activation of the EGFR/Akt/NF- $\kappa$ B/cyclinD1 survival signaling pathway in human cholesteatoma epithelium. *European archives of oto-rhino-laryngology*, 271(2), 265–273.
49. Lynrah, Z. A., Bakshi, J., Panda, N. K. and Khandelwal, N. K. 2013. Aggressiveness of pediatric cholesteatoma. Do we have an evidence? *Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery*, 65(3), 264–268.
50. Louw, L. 2010. Acquired cholesteatoma pathogenesis: stepwise explanations. *The Journal of laryngology and otology*, 124(6), 587–593.
51. Mallet, Y., Nouwen, J., Lecomte-Houcke, M. and Desautly, A. 2003. Aggressiveness and quantification of epithelial proliferation of middle ear cholesteatoma by MIB1. *The Laryngoscope*, 113(2), 328–331.
52. Meyer, J. E., Harder, J., Görögh, T., Schröder, J. M. and Maune, S. 2000. hBD-2-Genexpression in nasaler Schleimhaut [hBD-2 gene expression in nasal mucosa]. *Laryngo- rhino- otologie*, 79(7), 400–403.
53. Mertz, P. M., DeWitt, D. L., Stetler-Stevenson, W. G. and Wahl, L. M. 1994. Interleukin 10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. *The Journal of biological chemistry*, 269(33), 21322–21329.
54. Moon, S. K., Lee, H. Y., Li, J. D., Nagura, M., Kang, S. H., Chun, Y. M., Linthicum, F. H., Ganz, T., Andalibi, A. and Lim, D. J. 2002. Activation of a Src-dependent Raf-MEK1/2-ERK signaling pathway is required for IL-1alpha-induced upregulation of beta-defensin 2 in human middle ear epithelial cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1590(1-3), 41–51.
55. Morales, D. S., Penido, N.deO., da Silva, I. D., Stávale, J. N., Guilherme, A. and Fukuda, Y. 2007. Matrix metalloproteinase 2: an important genetic marker for cholesteatomas. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 73(1), 51–57.
56. Mosser, D. M. and Zhang, X. 2008. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological reviews*, 226, 205–218.
57. Olszewska, E., Chodynicki, S. and Chyczewski, L. 2004. Znaczenie angiogenezy w patogenezie perlaka ucha środkowego u dorosłych [Role of angiogenesis in the pathogenesis of cholesteatoma in adults]. *Otolaryngologia polska = The Polish otolaryngology*, 58(3), 559–563.
58. Olszewska, E., Matulka, M., Mroczko, B., Pryczynicz, A., Kemon, A., Szmitkowski, M., Mierzwiński, J. and Pietrewicz, T. 2016. Diagnostic value of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 in cholesteatoma. *Histology and histopathology*, 31(3), 307–315.
59. Ozola, L. and Pilmane, M. 2023. Local Defense Factors in Cleft-Affected Palate in Children before and during Milk Dentition Age: A Pilot Study. *Journal of personalized medicine*, 14(1), 27.

60. Palkó, E., Póliska, S., Sziklai, I. and Penyige, A. 2018. Analysis of KRT1, KRT10, KRT19, TP53 and MMP9 expression in pediatric and adult cholesteatoma. *PLoS one*, 13(7), e0200840.
61. Park, K., Moon, S. K., Choung, Y. H. and Choi, H. S. 2003. Expression of beta-defensins in human middle ear cholesteatoma. *Acta oto-laryngologica*, 123(2), 236–240.
62. Petrelli, F., Viale, G., Cabiddu, M. and Barni, S. 2015. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast cancer research and treatment*, 153(3), 477–491.
63. Pilmane, M., Jain, N. and Vitenberga-Verza, Z. 2021. Expression Analysis of *FGF/FGFR* and *FOX* Family Proteins in Mucosal Tissue Obtained from Orofacial Cleft-Affected Children. *Biology*, 10(5), 423.
64. Poiraud, C., Quereux, G., Knol, A. C., Zuliani, T., Allix, R., Khammari, A. and Dreno, B. 2012. Human  $\beta$ -defensin-2 and psoriasin, two new innate immunity targets of zinc gluconate. *European journal of dermatology: EJD*, 22(5), 634–639.
65. Pozzi, A., LeVine, W. F. and Gardner, H. A. 2002. Low plasma levels of matrix metalloproteinase 9 permit increased tumor angiogenesis. *Oncogene*, 21(2), 272–281.
66. Preciado, D. A. 2012. Biology of cholesteatoma: special considerations in pediatric patients. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 76(3), 319–321.
67. Rees, J. M. and Gillis, J. A. 2022. Distinct proliferative and middle ear skeletal-patterning functions for SHH-expressing epithelia in the chick hyoid arch. *Developmental biology*, 489, 98–108.
68. Ren, X., Cui, P., Chen, W. and Xu, M. 2005. The expression and significance of human beta-defensin 2 in middle ear cholesteatoma epithelium. *Journal of clinical otorhinolaryngology*, 19(7), 313–314.
69. Rezende, C. E., Souto, R. P., Rapoport, P. B., Campos, L.d, and Generato, M. B. 2012. Cholesteatoma gene expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors by RT-PCR. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 78(3), 116–121.
70. Ricciardiello, F., Cavaliere, M., Mesolella, M. and Iengo, M. 2009. Notes on the microbiology of cholesteatoma: clinical findings and treatment. *Acta otorhinolaryngologica Italica: organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*, 29(4), 197–202.
71. Saadane, A., Soltys, J. and Berger, M. 2005. Role of IL-10 deficiency in excessive nuclear factor-kappaB activation and lung inflammation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 115(2), 405–411.
72. Schönermark, M., Mester, B., Kempf, H. G., Bläser, J., Tschesche, H. and Lenarz, T. 1996. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in human cholesteatomas. *Acta oto-laryngologica*, 116(3), 451–456.

73. Schürmann, M., Goon, P. and Sudhoff, H. 2022. Review of potential medical treatments for middle ear cholesteatoma. *Cell communication and signaling: CCS*, 20(1), 148.
74. Shuman Moss, L. A., Jensen-Taubman, S. and Stetler-Stevenson, W. G. 2012. Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis. *The American journal of pathology*, 181(6), 1895–1899.
75. Sikka, K., Sharma, S. C., Thakar, A. and Dattagupta, S. 2012. Evaluation of epithelial proliferation in paediatric and adult cholesteatomas using the Ki-67 proliferation marker. *The Journal of laryngology and otology*, 126(5), 460–463.
76. Smirnova, M. G., Birchall, J. P. and Pearson, J. P. 2004. The immunoregulatory and allergy-associated cytokines in the aetiology of the otitis media with effusion. *Mediators of inflammation*, 13(2), 75–88.
77. Song, J. J., Chae, S. W., Woo, J. S., Lee, H. M., Jung, H. H. and Hwang, S. J. 2007. Differential expression of human beta defensin 2 and human beta defensin 3 in human middle ear cholesteatoma. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 116(3), 235–240.
78. Stamatas, G. N., Roux, P. F., Boireau-Adamezyk, E., Lboukili, I. and Oddos, T. 2023. Skin maturation from birth to 10 years of age: Structure, function, composition and microbiome. *Experimental dermatology*, 32(9), 1420–1429.
79. Stefanini, M., De Martino, C. and Zamboni, L. 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216(5111), 173–174.
80. Suchozebrska-Jesionek, D., Szymański, M., Kurzepa, J., Gołabek, W. and Stryjecka-Zimmer, M. 2008. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 in middle ear cholesteatoma. *Journal of otolaryngology - head & neck surgery*, 37(5), 628–632.
81. Sudhoff, H., Dazert, S., Gonzales, A. M., Borkowski, G., Park, S. Y., Baird, A., Hildmann, H. and Ryan, A. F. 2000. Angiogenesis and angiogenic growth factors in middle ear cholesteatoma. *The American journal of otology*, 21(6), 793–798.
82. Takabatake, K., Shimo, T., Murakami, J., Anqi, C., Kawai, H., Yoshida, S., Wathone Oo, M., Haruka, O., Sukegawa, S., Tsujigiwa, H., Nakano, K. and Nagatsuka, H. 2019. The Role of Sonic Hedgehog Signaling in the Tumor Microenvironment of Oral Squamous Cell Carcinoma. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5779.
83. Teibe, U. 2007. Biologiškā statistika. LU
84. Wehkamp, K., Schwichtenberg, L., Schröder, J. M. and Harder, J. 2006. Pseudomonas aeruginosa- and IL-1beta-mediated induction of human beta-defensin-2 in keratinocytes is controlled by NF-kappaB and AP-1. *The Journal of investigative dermatology*, 126(1), 121–127.

85. Welkoborsky, H. J., Jacob, R. S. and Hinni, M. L. 2007. Comparative analysis of the epithelium stroma interaction of acquired middle ear cholesteatoma in children and adults. *European archives of oto-rhino-laryngology*, 264(8), 841–848.
86. Xu, Y., Tao, Z. Z., Hua, Q. Q., Wang, X. C., Xiao, B. K. and Chen, S. M. 2009. Activation of nuclear factor-kappaB and aberrant gene expression of interleukin 6 in middle ear cholesteatoma. *Chinese journal of otorhinolaryngology head and neck surgery*, 44(3), 192–196.
87. Yeşilova, M., Görür, K., Ismi, O., Özcan, C. and Büyükafşar, K. 2017. The Role of Rho/Rho-Kinase Pathway in the Pathogenesis of Cholesteatoma. *Otology & neurotology*, 38(4), 516–520.
88. Yetiser, S., Satar, B. and Aydın, N. 2002. Expression of epidermal growth factor, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1alpha in chronic otitis media with or without cholesteatoma. *Otology & neurotology*, 23(5), 647–652.
89. Zang, J., Yang, B., Feng, S. and Jiang, X. 2019. Low expression of microRNA-125b enhances the expression of STAT3 and contributes to cholesteatoma growth. *Archives of medical science: AMS*, 18(6), 1596–1606.
90. Zhu, J., Zhang, X., Ai, L., Yuan, R. and Ye, J. 2019. Clinicohistopathological implications of MMP/VEGF expression in retinoblastoma: a combined meta-analysis and bioinformatics analysis. *Journal of translational medicine*, 17(1), 226.



## Pateicības

Vislielākā pateicība mana promocijas darba vadītājai *Dr. med., Dr. habil. med.* profesorei Mārai Pilmanei par palīdzību, sniegtajiem padomiem, profesionālismu, nenovērtējamo atbalstu grūtākos brīžos un ārkārtīgi lielo ieguldījumu šī darba tapšanas laikā. Kā arī visvairāk novērtēju spēju motivēt mani promocijas darba izstrādes laikā.

Izsaku lielu pateicību otrai promocijas darba vadītājai *Dr. med.* docentei Guntai Segļiņai par manis uzrunāšanu un virzīšanu promocijas darba veikšanai, konstruktīviem padomiem un ieguldīto darbu šī darba tapšanas laikā.

Izsaku pateicību visiem RSU Anatomijas un antropoloģijas institūta darbiniekiem par iespēju izmantot darba telpas un inventāru, kā arī palīdzību, ja radās jautājumi. Īpaša pateicība RSU AAI Morfoloģijas laboratorijas laborantei Natālijai Morozai par sniegtajām zināšanām un palīdzību preparātu tapšanā.

Pateicos Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas un Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas Izglītības un zinātnes departamentiem par iespēju un atbalstu promocijas darba izstrādē.

Pateicos RSU Statistikas laboratorijai, īpaši lektorei Mārai Grēvei, par palīdzību statistikas aprēķinos.

Pateicos RSU par atbalstu publikāciju tapšanā un iespēju publicēt darbus zinātniskajos žurnālos.

Paldies Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas Ausu, kakla, deguna slimību klīnikas kolēģiem par atbalstu un sapratni promocijas darba izstrādes laikā.

Vissirsnīgākais paldies par atbalstu un uzmundrinājumiem manai ģimenei, īpaši sievai Lienei un dēlam Bruno.