



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ
ANABİLİM DALI

EDİNİLMİŞ KOLESTEATOMDA LANGERHANS HÜCRELERİ,
Ki-67 ve APOPTOZİSİN YERİ

Dr. M. Volkan Akdoğan

UZMANLIK TEZİ

ANKARA

2008



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ
ANABİLİM DALI

EDİNİLMİŞ KOLESTEATOMDA LANGERHANS HÜCRELERİ,
Ki-67 ve APOPTOZİSİN YERİ

Dr. M. Volkan Akdoğan

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. İsmail Yılmaz

ANKARA

2008

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının ortaya çıkmasında, öncelikle tez danışmanım Doç. Dr. İsmail Yılmaz'ın, özverili ve sabırlı desteği ile bana da yansıtmış olduğu bıkmadan usanmadan çalışma alışkanlığı öncülük etmiştir. Başkent Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Levent N. Özlüoğlu, kliniğimizde yürütülmekte olan tüm bilimsel çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmaya da öncülük ederek, önümüze çıkan engellerin aşılmasında ve çalışma ile ilgili bilimsel ortamın sağlanmasında desteklerini esirgememiştir.

5 yıllık uzmanlık eğitimim süresince gerek teorik, gerekse pratik anlamda tüm bilgi birikimini bizlere aktarmaya çalışan Başkent Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nın önceki ve şimdiki tüm öğretim görevlilerine teşekkür ederim. Başkent Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi'ndeki tüm öğretim görevlilerine çalışmanın yürütülmesi sırasında, gerek deneklerin araştırmaya dahil edilmesinde, gerekse eğitime olan katkıları nedeniyle teşekkür ederim.

Oldukça özveri isteyen ve özenle yapılması gereken patolojik incelemeleri yaparak bu çalışmanın ortaya konulmasını sağlayan başta Dr. Tuba Canpolat olmak üzere tüm Başkent Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
I. TEŞEKKÜR.....	iii
II. İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
III. ÖZET	v
IV. İNGİLİZCE ÖZET.....	vi
V. KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ.....	vii
VI. ŞEKİL ve TABLOLAR DİZİNİ.....	ix
VII. GİRİŞ	1
VIII. GENEL BİLGİLER	4
IX. GEREÇ ve YÖNTEM.....	30
X. BULGULAR.....	39
XI. TARTIŞMA	42
XII. SONUÇ ve ÖNERİLER	54
XIII. KAYNAKLAR	55

ÖZET

Amaç: Langerhans hücrelerinin orta kulak kolesteatom patogeneğinde nasıl bir rol oynadığını, kolesteatomlu kulağın klinik özellikleri ile ilişkisini, hücre çoğalması ve programlı hücre ölümü belirteçleri kullanarak araştırmak.

Çalışma Dizaynı: İleriye yönelik kontrollü kör klinik çalışma

Yer: Başkent Üniversitesi Kulak Burun Boğaz ve Patoloji Anabilim Dalları

Gereç ve Yöntem: Kliniğimizde 2007-2008 yıllarında edinilmiş kolesteatomlu kronik otit tanısıyla ameliyat edilen 40 hasta çalışmaya alındı. Klinik ve patolojik özellikler karşılaştırıldı. Klinik olarak hastalık süresi, işitme durumu, bilgisayarlı tomografi (BT) ve ameliyat bulguları not edildi. Patolojide Langerhans hücrelerinin kolesteatomdaki ve dış kulak yolu cildindeki dağılımı hesaplandı, hücre çoğalması için Ki-67 ve apoptozis için APO 2.7 boyaları yapıldı, epitel kalınlığı ve inflamasyon yoğunluğu saptandı. Verilerin istatistik değerlendirmesinde Levene testi, Student T-test, Mann-Whitney U testleri kullanıldı.

Bulgular: Çalışmaya alınan 23'ü erkek, 17'si kadın 40 hastanın yaş ortalaması 35 ± 16 yıl idi. Hastalık süresi 12.7 ± 10.7 yıl, ortalama saf ses ortalaması 54 ± 19 dB ve ortalama hava kemik aralığı 31 ± 12 dB idi. BT'de %85 olguda mastoid kemikle sınırlı hastalık varken %15 olguda temporal kemik dışına çıkmış hastalık vardı. %32.5 hastada tüm kemikçikler yıkılmışken, %35 hastada malleus ve inkus yıkılmıştı. Olguların %20'sinde kapalı teknik, %80'inde açık teknik kullanıldı. Ameliyat sırasında %20 olguda fasiyal kanalın, %17.5 olguda lateral semisirküler kanalın açıkta olduğu; %30 olguda tegmen mastoideumda eksiklik olduğu; %55 olguda skutumun yenik olduğu görüldü. Patolojik incelemeye göre Langerhans hücrelerinin kolesteatom epitelinde dış kulak yoluna göre daha yoğun toplandığı ($p < 0.001$), Ki-67 indeksinin kolesteatom epitelinde daha yüksek olduğu ($p < 0.001$), apoptozisin kolesteatom epitelinde daha belirgin olduğu ($p < 0.001$) saptandı. Klinik ve patolojik bulgular arasındaki tek anlamlı ilişki açık teknik yapılan olgularda Ki-67 indeksi ($p = 0.041$) ve apoptozis yoğunluğunun ($p = 0.032$) kapalı teknik kullanılanlara göre daha yüksek olması idi.

Sonuç: Bu çalışma ile konağın orta kulak kolesteatomlarına karşı yoğun Langerhans hücre infiltrasyonu ile yanıt verdiği, hücre çoğalması ve programlı hücre ölümü belirteçleri kullanarak bulunmuştur. İnflamasyonun yoğun olduğu grupta Ki-67 skorlarının istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hücre çoğalması ve programlı hücre ölümünün daha yoğun olduğu olgulardaki tedavi seçeneğimiz olan açık tekniğin isabetli bir seçim olduğu görüldü.

ABSTRACT

The role of Langerhans cells, Ki-67 and apoptosis in acquired cholesteatoma

Objective: The aims of the study were to investigate the relationship of Langerhans cells with pathogenesis and clinical properties of middle ear cholesteatoma, using cell proliferation and programmed cell death markers.

Study Design: Prospective, blind, controlled clinical study

Study Settlement: Başkent University Departments of Otorhinolaryngology and Pathology

Material and Method: Forty patients that had been operated with the diagnosis of chronic otitis due to acquired cholesteatoma, in the years of 2007 and 2008, were included in the study.

Findings: 23 male and 17 female patients were included in the study. Mean age of the patients was 35 ± 16 years. The duration of the disease was 12.7 ± 10.7 years. Average pure tone audiometry score was 54 ± 19 dB and air bone gap was 31 ± 12 dB, with an average. The disease was limited to the mastoid bone in 85% and extending out of the temporal bone in 15% of the patients. All of the ossicles were destructed in 32.5% and malleus and incus were destructed in 35% of the patients. Closed technique was used in 20% and open technique was used in 80% of the patients. Facial canal and lateral semicircular canal was found to be dehiscant in 20% and in 17.5% of the patients, respectively. Tegmen mastoideum was defective in 30% and scutum was found to be destructed in 55% of the patients. Langerhans cells were found to be more densely cumulated at cholesteatoma epithelium when compared with external ear canal skin ($p < 0.001$). Ki-67 index was higher in cholesteatoma epithelium ($p < 0.001$). Apoptosis was more prominent in cholesteatoma epithelium ($p < 0.001$). The sole significant relationship between clinical and pathologic findings was the higher Ki-67 index ($p = 0.041$) and apoptosis rate ($p = 0.032$) in patients that had been operated with open technique.

Conclusion: It was found that a dense Langerhans cell infiltration occurred as a host response against middle ear cholesteatoma, using cell proliferation and programmed cell death markers. Ki-67 scores were found to be higher in the group with high inflammation rates and this finding was statistically significant. It was found that open technique was the right choice of surgical treatment in patients in whom cell proliferation and programmed cell death rates were high.

KISALTMALAR ve SİMGELER

AEC	: 3-amino-9-ethylcarbazole
ANOVA	: Varyans analizi (Analysis of variance)
AOM	: Akut otitis media
APO2.7	: Mitokondrial membranda yerleşen ve apoptozisin erken fazlarında ortaya çıkan bir protein
BT	: Bilgisayarlı tomografi
C	: Kompleman
Cm	: Santimetre (centimeter)
CD4	: T helper hücreleri, düzenleyici T hücreleri, monositler, makrofajlar ve dendritik hücrelerin yüzeyinde bulunan bir glikoproteindir (Cluster of differentiation 4). Class II MHC proteinlerine spesifiktir.
CD8	: T hücre reseptörünün ko-reseptörü olarak işlev gören bir transmembran glikoproteindir. Class I MHC proteinlerine spesifiktir.
CWD	: Canal wall down. Dış kulak yolu arka duvarının indirildiği timpanomastoidektomi tekniği.
CWU	: Canal wall up. Dış kulak yolu arka duvarının korunduğu timpanomastoidektomi tekniği.
dB	: Desibel
DNA	: Deoksiribonükleik asit (Deoxyribonucleic acid)
dUTP	: 2'-deoksiüridin 5'-trifosfat (2'-deoxyuridine 5'-triphosphate)
EGF	: Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor)
EGF-R	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü (Epidermal growth factor receptor) DKY: Dış kulak yolu
ELAM	: Endotel kaynaklı lökosit adezyon molekülü (Endothelial derived leukocyte adhesion molecule)
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor)
Go	: Hücre döngüsünün Go fazı. Hücrenin “post-mitotik” olarak da bilinen dinlenme ya da istirahat fazı.
G1	: Hücre döngüsünün G1 fazı. Hücrenin interfaz aşamasında, sitokinezisten (sitoplazma, organeller ve hücre zarının bölünmesi) sonraki, S fazından önceki dönem. Bu dönem içerisinde hücrede, yeni organeller sentezlenir, büyük miktarda protein sentezi yapılır.
G2	: Hücre döngüsünün G2 fazı. İnterfazın son aşamasıdır. Mitoza hazırlanan hücrenin hızlı büyüme dönemidir.
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H&E	: Hematoksilen-eozin
HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü (Human immunodeficiency virus)
ICAM	: İntersellüler (hücreler arası) adezyon molekülü (Intercellular adhesion molecule)
IFN-gammaR	: İnterferon-gamma reseptörü (IFN- γ , Interferon-gamma receptor)
Ig	: İmmünglobulin
IL	: İnterlökin (Interleukin)

KGf-R	: Keratinosit büyüme faktörü reseptörü (Keratinocyte growth factor receptor)
Ki-67	: İnsanlarda MKI67 geni tarafından kodlanan, hücre döngüsünün tüm aktif fazlarında beliren ancak dinlenme fazında tespit edilmeyen, bu nedenle hücresel çoğalma belirteci olarak kullanılan bir protein. MKI67 olarak da isimlendirilmektedir.
KOM	: Kronik otitis media
LSSK	: Lateral semisirküler kanal
M	: Hücre döngüsünün M fazı, Mitoz fazı. Mitoz ve sitokinezisin (sitoplazma, organeller ve hücre zarının bölünmesi) gerçekleştiği dönem.
MHC	: Major histokompatibilite kompleksi (Major histocompatibility complex)
MIB-1	: Mindbomb homolog 1 (Drosophila). Ki-67 antijenine karşı gelişen monoklonal antikordur.
Mm	: Milimetre (milimeter)
mM	: Milimolar
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
NaCl	: Sodyum klorür
NF	: Nükleer faktör
NY, ABD	: New York, Amerika Birleşik Devletleri
p	: İstatistiksel olasılık (probability)
PBS	: Protein blocking solution
PCNA	: Prolifere olan hücre çekirdek antijeni (Proliferating cell nuclear antigen)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
PORP	: Parsiyel ossiküler replasman protezi (Partial ossicular replacement prosthesis)
S	: Hücre döngüsünün S fazı, Sentez fazı. Hücrenin, interfaz aşamasında, G1 fazı ile G2 fazı arasındaki dönem. Bu dönem içerisinde hücrede, DNA sentezi ya da replikasyon gerçekleşir.
SK	: Sitokeratin
St.	: Stratum
T1, T2	: Sırasıyla T1 ve T2 ağırlıklı manyetik rezonans görüntüleme kesitlerini tanımlamak için kullanılmıştır.
TBS	: Tris-buffered saline
TGF-alfa	: Transformasyonu sağlayan büyüme faktörü-alfa (TGF- α , transforming growth factor-alfa)
TGF-beta	: Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β , Transforming growth factor-beta)
TNF	: Tümör nekroz faktörü (Tumor necrosis factor)
TORP	: Total ossiküler replasman protezi (Total ossicular replacement prosthesis)
TUNEL	: Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP nick-end labeling
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor)

ŞEKİL ve TABLOLAR

Sayfa

Şekil 1:	Kolesteatom epiteli (epitel kalınlığı 2.5mm den kalın) X200 H.E	31
Şekil 2:	Kolesteatom epiteli (epitel kalınlığı 2.5 mm den ince) X200 H.E	32
Şekil 3:	Kolesteatom epitel altında yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu X200 H.E	32
Şekil 4:	Kolesteatom epitelinde CD1a boyanması X200.....	33
Şekil 5:	Kolesteatom epitelinde CD1a boyanması X400.....	34
Şekil 6:	Kolesteatom epitelinde nükleer Ki-67 boyanması X 200.....	35
Şekil 7:	Kolesteatom epitelinde nükleer Ki- 67 boyanması X400.....	35
Şekil 8:	Kolesteatom epitelinde ApopTag boyanması X200.....	37
Şekil 9:	ApopTag ile boyanan epitel hücre çekirdekleri X400.....	37
Tablo 1:	Operasyon bulguları	40
Tablo 2:	Kolesteatom epiteli ve DKY cildinde Langerhans, Ki-67 ve apoptotik hücre oranları.....	40
Tablo 3:	Klinik ve patolojik özelliklerin karşılaştırılması sonucunda elde edilen p değerleri	41

GİRİŞ

Kolesteatom kulak burun boğaz hekimleri için yeni bir antite değildir. Bununla birlikte patogenezi halen tam olarak anlaşılamamış olan kolesteatom deneyimli hekimler için bile bazen tedavisi zor bir problem olabilmektedir. Yüzyıl önce kolesteatom ölümcül bir hastalık kabul ediliyordu ve tedavide temel amaç hastayı ölümden kurtarmaktı. Günümüzde ise amaç kulak burun boğazdaki gelişmelerle birlikte, kolesteatomu tamamen eradike ederken işitmeyi olabildiğince arttırmak ve hastalıksız bir kulak yaratmak olmuştur.

Kolesteatom orta kulağın histopatolojik olarak benign, klinik olarak agresif ve invazif potansiyeli olan bir tümördür. Orta ve iç kulak yapılarını destrükte ederek işitme azlığı, vestibüler disfonksiyon, fasiyal paralizi ve ölümcül intrakranial komplikasyonlara neden olabilir (1).

Kolesteatom için pek çok sınıflandırma önerilmişse de günümüzde yaygın olarak etiyojisine göre sınıflandırılır. Temelde konjenital (primer) kolesteatom ve edinilmiş kolesteatom olarak ikiye ayrılır. Edinilmiş kolesteatom da birincil edinilmiş ve ikincil edinilmiş kolesteatom olarak iki başlık altında incelenir (2).

Edinilmiş kolesteatom oluşumunda öne sürülen teorilerden günümüzde en çok kabul göreni invajinasyon teorisidir. Öne sürülen diğer teoriler, orta kulak mukozasının yassı epitele metaplazisi, bazal keratinositlerin orta kulağa göç etmeleri ve kulak zarındaki bir delik yoluyla epitelin içeriye doğru büyümesidir (2).

Kolesteatom oluşumu ile ilgili olarak öne sürülen tüm teorilerde ortak payda, artmış inflamasyon ile birlikte hücre proliferasyonu ve farklılaşmasıdır (3). Daha önceki çalışmalarda patogenezi, üç ana başlık temelinde araştırılmıştır: 1) hücre farklılaşması, 2) hücre çoğalması, 3) kendi kendine hücre ölümü (apoptozis) mekanizmaları.

İnvajinasyon teorisine göre östaki disfonksiyonu sonucu kulak zarının pars flaccida bölgesinin retraksiyonu sonucunda kolesteatom oluşmaktadır. Retraksiyon cebi kendini temizleyemediği zaman debrisler (keratin debris, intrasellüler debrisler ve bakteriler) birikmekte ve inflamasyon tetiklenmektedir (4). İnflamasyon için en önde gelen tetikleyici etken olan orta kulağın bakteriyel enfeksiyonları, aşırı inflamatuvar yanıtı neden

olmaktadır. Bu ise Langerhans hücre tutulumu, T-lenfositler ve etkin makrofajlar gibi farklı bağışıklık yanıtlarıyla sitokin düzeylerini artırmaktadır. Artan sitokinlerin aracılık ettiği inflamasyon ile hücre çoğalması ve kemik yıkımı sonucunda mikro çevrede büyüme teşvik edilmiş olur (5).

Langerhans hücreleri çoğunlukla epidermiste yerleşik dentritik hücrelerdir. Langerhans hücrelerinin derinin immün savunma mekanizmalarında rol oynadığı bilinmektedir. Epidermal Langerhans hücrelerinin kütanöz savunma sistemindeki rolü temelde antijen sunucu hücre olarak rol oynamalarından kaynaklanır. Langerhans hücreleri antijenleri tanıyarak bunları T-lenfositlere ve makrofajlara sunarlar (6,7).

Langerhans hücreleri kolesteatom patogeneğinde de, debrislerdeki antijenik yapıları tespit edip, bu antijenlere bağlanarak, bunların lenfositlere tanıtılmasında; başka bir deyişle antijen sunucu hücreler olarak rol oynamaktadırlar. Sonuçta ortaya çıkan inflamatuvar yanıt kolesteatomda hastalığın bertaraf edilmesinde yetersiz kalmakta ve süreç kronik hal almaktadır (4).

Kolesteatomda subepitelial granülasyon dokusundaki mononükleer inflamatuvar hücrelerin kollajenazlar, lizozomal enzimler, prostoglandinler ve diğer demineralizasyon faktörlerini salgılayarak kemik erimesinde rol oynadıkları bilinmektedir. Ancak epitelial tabakanın bu süreçte oynadığı rol Langerhans hücrelerinin kolesteatom epitelinde gösterilmesi ve bu süreçteki rolleri konusundaki araştırmalarla gündeme gelmiştir (4).

Langerhans hücre infiltrasyonunun çeşitli kanserlerde prognostik açıdan anlamlı olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda artan infiltrasyonun daha iyi bir prognozu gösterdiği tespit edilmiştir (8).

Normalde keratinositlerde hücre proliferasyonu ve programlanmış hücre ölümü arasında bir denge söz konusudur. Bu denge kolesteatomda bozulmuştur ve aşırı proliferasyon olan epitel artan miktarda keratin birikimine neden olur (9). Epitel hiperprolifere olmaya başladığında kolesteatomda destrüktif süreçte başlar. Kolesteatomun hiperproliferatif karakteristiklerini ortaya koymak için sitokeratin, Ki-67 ve PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (10,11).

Bir antijenin proliferasyon belirteci olarak kullanılabilmesi için iki temel özelliğinin olması gerekir: 1) Öncelikle bu antijen tüm hücre türlerinde tüm hücre döngüsü boyunca var olmalıdır, 2) bu antijen hücrenin, hücre döngüsünde non-proliferatif faza geçişi ile birlikte ortadan kalkmalıdır (12).

Ki-67, çoğalan hücrelerde görülen bir çekirdek proteindir. Hücre döngüsünün tüm aktif fazlarında (G1, S, M ve G2) görülür. Go ve erken G1 fazında yoktur. Hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi bir şekilde gösteren protein olup, mitotik indeks ve tümör derecelendirilmesinde kullanılmaktadır (9,13). Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda Ki-67 proteinine karşı uygulanan monoklonal antikorların patolojik ve normal somatik hücrelerde proliferasyon kapasitesini gösterdiği tespit edilmiştir. Orta kulak kolesteatomunda hücre çekirdeği boyanma kalıpları ve hücre döngüsü ile ilişkili Ki-67 salınımı üzerine yapılan bir çalışmada, Ki-67'nin orta kulak kolesteatomu için güvenilir ve sabit bir çoğalma simgesi olduğu saptanmıştır. Hatta Ki-67 olumlu hücrelerin kolesteatomun suprabazal ve bazal tabakalarında daha çok dağıldığı gösterilmiştir (12,14).

Apoptozis ile ilgili yapılan çalışmalarda kolesteatom patogenezinde önemli rol oynadığı, keratin debrislerin farklılaşma ve birikiminin bir parçası olduğu; apoptotik hücrelerin normal epidermin granüler tabakasında, kolesteatom epitelinde ise suprabazal tabakalarda görüldüğü bildirilmiştir. Kolesteatom epitelinde apoptozisin mekanizmasını, apoptotik hücrelerin hangi tabakalarda dağıldığını ve apoptozis kapasitesini bilmek, bu sık görülen kulak hastalığının çok özel davranışlarının açıklanmasında, hastalığın saldırganlığı hakkında bilgi sahibi olunmasında ve rekürrens eğiliminin tespit edilmesinde önemli bilgilere ışık tutabilir (1).

Bu çalışma hala karanlıkta kalan kolesteatom patogenezinin aydınlatılması amacı ile yapılmıştır. Langerhans hücrelerinin kolesteatom dokusunda ne gibi bir rol oynadığı, kolesteatomlu kulağın klinik özellikleri ile ilişkisi, hücre çoğalmasının belirleyicisi olarak kullandığımız Ki-67 ile olan ilişkisi, apoptozis mekanizması ile olan ilişkisi bu çalışmanın ana başlıklarını oluşturmuştur. Son 10 yılda orta kulak kolesteatomunun patogenezi üzerine yapılan çalışmalara genel olarak bakıldığında, süreci neoplastik oluşumlara benzetme ve patogenezi de bu yönde şekillendirme çabalarının artmış olduğu görülmektedir. Kimi çalışmaların sonuçları gerçekten de nedeni bilinmeyen bu durumun patogenezindeki boşlukları doldurmakta, kimileri ise havada kalmaktadır. Literatürde daha önce yapılmamış olan bu çalışmanın konusu, bazı baş-boyun kanserlerinde prognostik önemi kanıtlanmış olan Langerhans hücre infiltrasyonunun, orta kulak kolesteatomlarının oluşum sürecinde rolü olup olmadığını araştırmaktır. Bunu yaparken geçerliliği kanıtlanmış klinik ve patolojik değişkenlerden yararlanarak bulguların sağlam temeller üzerine oturtulması hedeflenmiştir.

GENEL BİLGİLER

a) Tanım, Epidemiyoloji ve Tarihçe:

Kolesteatom keratinize çok katlı yassı epitelin neden olduğu epidermal inklüzyon kistidir. Histolojik olarak epidermal matriks tabakası ile granülasyon dokusu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu içeren bağ dokusundan, başka bir ifadeyle perimatriks tabakasından oluşur (2,15). Perimatriks tabakasının kalınlığı değişiklik gösterebilmektedir. Matriks tabakasını oluşturan epidermisteki hiperkeratozis ve keratin debrislerin dökülmesi, çevresinde inflamatuvar reaksiyona neden olan kistik bir kitle oluşumuna yol açmaktadır. Kolesteatom ekstradural ve intradural olarak görülebilmektedir. Ekstradural olarak kolesteatom en sık orta kulak boşluğunu tutar. Bununla birlikte mastoid, petröz apeks ve dış kulak yolu (DKY) gibi petröz kemiğin tüm bölümleri etkilenebilir. İntradural olarak görülen kolesteatom aynı zamanda epidermoid olarak da isimlendirilmektedir. İntradural olarak kolesteatom pek çok anatomik bölgede görülebilmekle beraber en sık serebellopontin köşede bildirilmiştir (2).

Kolesteatom sıklığı, beyaz ırk için çocuklarda 3/100.000, yetişkinlerde ise 9.2/100.000 olarak bildirilmektedir. Literatürdeki çeşitli yayınlarda erkek cinsiyette daha sık görüldüğü bildirilmiştir. En sık beyaz ırkta, daha az sıklıkta Afrikalılarda da görülebilen kolesteatomun, Hindistan dışındaki Asya topluluklarında görülme olasılığı çok düşüktür. Kemppainen ve ark. ise toplumun tüm sosyoekonomik gruplarında kolesteatom sıklığının aynı olduğunu bildirmektedir. Eskimolardaki düşük kolesteatom prevalansı ise herkes tarafından kabul edilen bir gerçektir. Bunun nedeni olarak da, bu etnik grupta nazofarenksin çok geniş olması ve bu durumun orta kulak havalanmasını arttırarak, kronik kulak hastalıklarının sekellerinden koruyucu bir faktör olarak davranması gösterilmektedir. Yarık damak gibi kronik östaki disfonksiyonu olan hastalarda ise kolesteatom görülme ihtimali normal toplumdan daha fazladır. Kolesteatom izlenen hastaların karşı kulaklarında kolesteatom görülme ihtimali de normalden yüksektir (3,16-19).

Kolesteatom ile ilgili olduğu düşünülen literatürdeki ilk yayın 1683 yılında Duverney tarafından yapılmıştır. Duverney bu yazısında DKY'den kaynaklanan ve postauriküler bölgeye fistülize olan bir apsedan bahsetmektedir. Mastoid apekse fistülize

olan bu apsenden kağıt benzeri döküntülerin olduğu ve etrafa kötü bir koku yayıldığı bildirilmiştir (2,20).

Kolesteatoma ismi sonundaki (-oma) eki ile bir tümörü akla getirirken (chole-) kelimesi kolesterini, (-stea-) ise yağ dokusunu akla getirmektedir. Oysa kolesteatom gerçek anlamda ne bir tümördür, ne de yağ dokusu ya da kolesterole ait bir oluşum içerir. Bu terim ilk kez 1838 yılında Alman fizyolog Johannes Mueller tarafından kullanılmıştır. İlk tanımlandığında, yağ dokusunun inci gibi dizilim gösteren tümörü olduğu ve diğer yağ doku tümörlerinden poligonal hücrelerin arasındaki biliyer yağ dokusu (kolesterin) ile ayırtedilebileceği söylenmiştir (19,20).

Hastalığın patolojik özelliklerini ilk tanımlayan, 1829 yılında Fransız patolog Cruveilhier olmuştur. Cruveilhier kolesteatomun subaraknoid mesafe hücrelerinden gelişen avasküler bir tümör olduğunu bildirmiş ve makroskopik olarak kolestatomu ‘sedefsi inci benzeri tümör’ olarak tanımlamıştır (2,20). Aslında ‘inci benzeri tümör’ deyimini, kolesteatom terimine göre bu hastalığı tanımlamak için daha uygun bir ifadedir. Pek çok otolog, kolesteatom teriminin hastalığın anlamını tam olarak ifade etmemesi nedeniyle başka adlandırmaların kullanılmasını önermişlerdir. Kolesteatom terimi yerine kullanılması önerilen isimlerin başında ‘Schuknecht keratomu’ gelmektedir. Çünkü bu durum yağ dokusundan değil keratinden kaynaklanan bir durumdur ve kolesterin kristalleri bazen görülebilmekle birlikte, ayırt edici özelliği oluşturmamaktadır. Bununla birlikte kolesteatom terimi yerine önerilen isimlerin hiç birisi genel kabul görmemiş ve yaygınlaşmamıştır. Günümüzde hastalığı tanımlamak için genel kabul gören ve kullanılan terim Johannes Mueller tarafından kullanılan ‘kolesteatom’ terimidir (20).

Kolesteatom ile ilgili literatürdeki ilk çalışmalar Cruveilhier ve Virchow’a aittir. Bu ilk çalışmalar petröz kemiği tutan konjenital kolesteatom vakalarında yapılmıştır. Bu çalışmalarda kolesteatomun kan akımının olmadığı ve çekirdeğe sahip hücreler içermediği ifade edilmektedir. Cruveilhier kolesteatomun kistik bir yapısı olduğunu ve içeriğinin salgılanma sonrası oluştuğunu savunmuştur. Virchow ise 1855 yılında kolesteatomun konsantrik lamellar yapısını ateroma benzetmiştir. Virchow’un ateromlar ile kastettiği şey epidermal kistlerdir. Aynı zamanda kolesteatomun yassı hücreli kanserlerle benzerliklerini de ortaya koyan Virchow, bu benzerliğe karşın kolesteatomun benign olduğunu ifade etmektedir. Virchow’a göre, kolesteatom mezenkimal hücrelerden kaynaklanan heteroplastik bir tümördür ve farklılaşmaya uğramayan, daha sonra ise epidermal hücrelere farklılaşan kemik doku hücreleri kolesteatoma neden olmaktadır. Bu aynı zamanda

kolesteatomun, mezenkimal hücrelerin epitelyal hücrelere metaplazisi sonrasında oluştuğunu öne süren ilk görüştür (20).

Patologların kolesteatom terimi ve patolojisi üzerindeki bu ilk çalışmaları ile birlikte, kolesteatomun klinisyenler için önemi, lokalizasyonundan ve klinik davranışından kaynaklanmaktadır (20).

Cruveilhier ve Virchow tarafından sunulan kolesteatom vakaları petröz apeksi tutan konjenital kolesteatom olguları olduğu için, bu olgularla orta kulakta görülen kolesteatom olguları arasında ilişki kurulmasında güçlükler yaşanmıştır. Virchow, orta kulak kolesteatomu ile petröz apekte görülen kolesteatom olguları arasında bazı bağlantılar olabileceğini bildirmiştir. Kolesteatomun orta kulakta oluşumu ile ilgili ilk görüşler üç grupta toplanabilir. Bu görüşlerden ilkinde göre kolesteatom aslında DKY'deki bir patolojiye bağlıdır ve içeriye, orta kulağa doğru büyüme sonrası oluştuğuna inanılmaktadır. İkinci görüşe göre kolesteatom, inflamasyon sonucu ya da bu inflamatuvar ürünlerin mukozaya etkisi sonucu oluşmaktadır. Son görüşe göre ise embriyonel doku artığı olarak kolesteatom önceden beri orta kulakta bulunmaktadır. Kolesteatomun DKY'den orta kulağa hücre göçü sonrası oluştuğunu savunanlardan birisi olan Toynbee 1850 yılında kolesteatomun DKY'deki kıl folikülleri veya salgı bezlerinden geliştiğini öne sürmüştür (19,20).

Kolesteatomun inflamasyon sonucu ortaya çıktığını savunan otologlar arasında en çok ön plana çıkanlar Politzer ve Von Troeltsch'dır. Von Troeltsch 1868 yılında kolesteatomun kronik inflame orta kulak mukozasının neden olduğu koyulaşmış salgı olduğunu öne sürmüştür. Von Troeltsch bu koyulaşmış salgının, orta kulak mukozasının deskuamatif bir reaksiyonu ile oluştuğunu savunmaktadır. Von Troeltsch'a göre DKY'deki epidermal debris birikimi DKY kemik duvarını basınç etkisi ile osteolizise uğratmakta ve bunun sonucunda kolesteatom orta kulak ve mastoid kemiğe ulaşmaktadır. Bu teori 'orta kulak mukozasının deskuamatif inflamasyonu teorisi' olarak adlandırılmaktadır (2,19,20). Gruber, Wendt ve Rokitansky de kulak zarındaki perforasyonun neden olduğu kronik inflamasyonun, orta kulak mukozasında malpighian metaplazisine neden olarak deskuamasyona yol açtığını öne sürmüşlerdir. Epidermisin olmaması gereken orta kulak ve mastoid bölgesindeki varlığını açıkladığı için metaplazi teorisi 19. yüzyılın ikinci yarısında oldukça taraftar bulmuştur (2,19). Politzer ise kolesteatomun inflamatuvar mukozanın kistik epitelyal inklüzyonlarından geliştiğini öne sürmüş ve bunu glandüler tümörlerin oluşumuna benzetmiştir. Ancak Politzer'in bu teorisi epitelyal inklüzyonların orta

kulaktaki varlığını açıklayamadığı için çok fazla rağbet görmemiştir. Sonuç olarak Politzer de kolesteatom oluşumu için Gruber'in metaplazi teorisini kabul etmiştir (2,19,20).

Kolesteatomun DKY cildinden kaynaklandığını ve DKY'deki yassı hücrelerin inflamasyonun da etkisi ile, kulak zarındaki bir perforasyon yoluyla orta kulağa geçişi sonrası oluştuğunu ilk öne sürenler ise 19. yüzyılın sonunda Habermann ve Bezold olmuştur. Habermann ve Bezold'a göre orta kulağa geçen epidermis, normal ciltte olduğu gibi deskuamasyona uğramakta, ancak dökülen deri temizlenemediği için kolesteatom oluşmaktadır. Bu hipotez 20. yüzyılın ilk yarısında da pek çok otolog tarafından benimsenmiştir (2,19,20).

Kolesteatomun embriyonel doku artıklarından geliştiğini öne sürenlerden birisi yine Habermann'dır. Habermann bazı attik kolesteatomlarının oluşumunda embriyonel doku artıklarının da rol oynayabileceğini savunmaktadır. McKenzie ise Habermann ve Bezold'un migrasyon teorisini benimsememiştir. McKenzie'ye göre kolesteatom fetal hayattaki embriyonel doku artıklarından gelişmektedir. Bu hipotez özellikle konjenital kolesteatom oluşumu için günümüzde de geçerliliğini korumaktadır (2,19,20).

b) Sınıflandırma ve etiyopatogenez:

Kolesteatom için çeşitli yazarlar farklı ölçütlere dayanan sınıflandırma yöntemleri önermişlerdir. Tos, cerrahi prosedür ve prognoz için yol gösterici olması nedeniyle kolesteatomu kaynaklandığı anatomik lokalizasyona göre 3 gruba ayırmıştır: 1) Attik kolesteatomu: Attik ya da aditus uzanan pars flaccida retraksiyonu; beraberinde antrum, mastoid veya timpanik kaviteye yayılım olabilir, 2) Sinüs kolesteatomu: Pars tensanın posterosüperiora doğru timpanik sinus, posterior timpanum ya da daha ötesine uzanan retraksiyonu ya da perforasyonu, 3) Tensa kolesteatomu: Pars tensanın östaki tüpü ağzına doğru olan retraksiyonu ya da adezyonu (21). Meyerhoff ve Truelson 1986 yılında patofizyoloji, yerleşim yeri, östaki tüpü durumu, kemikçik zincir defekti ve komplikasyon varlığına göre kolesteatomu; a) primer edinilmiş, b) sekonder edinilmiş, c) tersiyer edinilmiş ve d) konjenital kolesteatom olarak dörde ayırmışlardır (22). Tos, ayrıca otoskopik muayene bulgularına göre de bir kolesteatom sınıflandırması önermiştir. Buna göre Tos kolesteatomları üç gruba ayırmaktadır: 1) attik kolesteatomu, 2) pars tensa I (marjinal hastalık), 3) pars tensa II (santral hastalık). Mills ve ark. Tos'un bu sınıflandırmasına 4. grup olarak; sağlam kulak zarının arkasında izlenen kolesteatomu eklemişlerdir (18,23). Kolesteatomdan etkilenen anatomik bölge göz önüne alınarak

yapılan Saleh ve Mills'in evrelendirmesine göre; S1: kolesteatomun başladığı bölge, S2: hastalığın başka bir bölgeye yayılması, S3: hastalığın üçüncü bir bölgeye yayılması, S4: hastalığın dördüncü bir bölgeye yayılması, S5: ilk bölge ile birlikte 4 veya daha fazla bölgenin tutulumu olarak belirtilmiştir. Bu sınıflandırmada yedi anatomik bölge değerlendirmeye alınmıştır. Bunlar; attik, antrum, orta kulak, mastoid, östaki tüpü, labirent ve orta kranial fossadır. Kemikçik tutulumuna göre de hastalar 4 gruba ayrılmıştır; O0: tüm kemikçikler intakt, O1: inkusta kemikçik zincir devamlılığını bozan defekt, O2: inkus ve stapes arkında erozyon, O3: malleus manubriumu ve incus yokluğu ile birlikte stapes arkında erozyon. Bu sınıflandırma hastalığın yaygınlığını ve klinik önemini tespit etmek için oldukça pratik bir sınıflandırmadır ve petröz apeksi tutan kolesteatomlar dışındaki tüm hastalıklara kolaylıkla uygulanabilir. Bu sınıflandırmada preoperatif komplikasyonlara göre kolesteatom üç guruba ayrılmıştır; C0: komplikasyon yok, C1: tek bir komplikasyonun varlığı, C2: iki veya daha fazla komplikasyon varlığı. Değerlendirmeye alınan komplikasyonlar ise; lateral semisirküler kanal (LSSK) fistülü, fasiyal paralizi, total sensörinöral işitme kaybı, sinüs trombozu ve intrakraniyal invazyondur. Bu komplikasyonlar sıklıkla hastalığın evresi ile ilişkili bulunmuştur (3,24).

Kolesteatom, modern otolojide daha çok etiyojisine göre sınıflandırılır ve temelde konjenital (primer) kolesteatom ve edinilmiş kolesteatom olarak ikiye ayrılır. Edinilmiş kolesteatom da birincil edinilmiş ya da attik retraksiyon cebi kolesteatomu ve ikincil edinilmiş kolesteatom olarak iki başlık altında incelenir. İkincil edinilmiş kolesteatom oluşumunda kulak zarındaki bir delikten orta kulağa epitel migrasyonu ya da iatrojenik olarak otolojik işlemler sırasında orta kulağa epitel ekimi rol oynar (2).

Konjenital kolesteatom ve edinsel kolesteatomun ayırımında Körner'in 1899 yılında tanımladığı ölçütler bir takım değişikliklere uğramakla birlikte halen geçerliliğini korumaktadır. Körner'e göre konjenital ya da primer kolesteatomun tanısı için üç ölçüt gereklidir: 1) Hastanın genç yaşta olması, 2) Kolesteatom tanısından önce hastanın herhangi bir kulak hastalığı olmaması, 3) Tanı anında kulak zarının normal olması (2,19). 1965 yılında Derlacki ve Clemis konjenital kolesteatom tanı ölçütlerini yeniden düzenlemişlerdir. Kulak zarının sağlam olması, önceden geçirilmiş kulak ameliyatı veya kulak travması olmaması, orta kulak mukozasının irritasyona uğramamış olması ve otit hikayesi olmaması konjenital kolesteatom tanı kriterleri olarak kabul edilmiştir. Levenson bu kriterlerden "önceden otit hikayesi olmaması"nı, konjenital kolesteatom tanısı için gerekli olmadığını belirterek tanı kriterlerinden çıkarmıştır (17,25,26).

Konjenital kolesteatom patofizyolojisi ile ilgili pek çok teori öne sürülmüştür. Bugün için en çok kabul gören teori embriyonel hayattaki epitelyal artıkların konjenital kolesteatoma neden olduğudur. Michaels 1986 yılında genç insan fetuslarında yapmış olduğu çalışmada, gestasyonun 10. ve 33. haftalarında orta kulağın anterosüperior kesiminde epidermal bir disk bulunduğunu göstermiştir. Bu disk normalde 8. ayın sonunda yok olmaktadır. Bu epidermal diskin 8. ayın sonunda yok olmaması halinde konjenital kolesteatom oluşmaktadır. (3,27,28). Konjenital kolesteatomun embriyonel hayattaki doku artıklardan kaynaklandığını destekleyen bir diğer çalışma da Kojima ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada konjenital kolesteatomdaki telomer uzunluğunun kontrol gurubu olarak kullanılan DKY cildine göre daha kısa olduğu tespit edilirken, edinilmiş kolesteatomda kontrol gurubu ile benzer telomer uzunlukları tespit edilmiştir. Telomer uzunluğu hücrelerin bölünme kapasitesini gösteren bir belirteçtir ve hücreler bölünmeye uğradıkça telomer boyu da azalmaktadır. Elde edilen konjenital kolesteatom örneklerindeki kısalmış telomer uzunlukları da bu hücrelerin embriyonel hayattaki doku artıklarından kaynaklandığını destekler niteliktedir (29).

Konjenital kolesteatom insidansı 100.000’de 0.12 olarak bildirilmiştir ve orta kulak konjenital kolesteatomlarının tüm kolesteatom vakalarının yaklaşık %2-5’ini oluşturduğu düşünülmektedir. Çocuklarda konjenital kolesteatomun ortalama görülme yaşı 5.6 ± 2.8 iken, çocuklarda edinilmiş kolesteatomun ortalama görülme yaşı 9.7 ± 3.3 ’dür (30,31).

Konjenital kolesteatomun klinikte en sık görülme şekli, sağlam bir kulak zarının arkasında fark edilen asemptomatik beyaz kitledir. Ancak ilerlemiş vakalarda iletim tipi işitme kaybı, fasiyal sinir paralizisi, labirent tutulumuna bağlı vertigo ve sensörinöral işitme kaybı görülebilir. Konjenital kolesteatom BT kesitlerinde sınırları belirgin hipodens kitle olarak gözlenir ve kontrast madde tutmaz. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) diğer orta kulak kitlelerinden ayırmda gerekebilir. T1 ağırlıklı kesitlerde beyin dokusuna göre genellikle hipointens bazen ise izointens homojen lezyon olarak izlenirken, T2 ağırlıklı kesitlerde beyin omurilik sıvısı gibi yüksek sinyal yoğunluğu gösterir. Histolojik olarak konjenital kolesteatom, edinilmiş kolesteatom ile benzer özellikler gösterir. Ayırıcı tanı klinik ve radyolojik bulgular ışığında yapılabilir (28).

Konjenital kolesteatom genellikle ön-üst kadrandan kaynaklanır ve arka üst kadrana doğru gelişir. Daha sonra attik ve mastoide doğru ilerler (3,32). Anatomik yayılımına göre konjenital kolesteatom üçe ayrılmaktadır. Tip 1 konjenital kolesteatomda, lezyon orta kulağa sınırlıdır ve manubrium mallei dışında kemikçik tutulumu yoktur. Tip 2 konjenital

kolesteatomda kitle arka-üst kadranda kemikçikleri tutmuş ve attığe yayılmıştır. Tip 3 kolesteatomda ise mastoid kemik tutulmuştur. Tip 1'de genişletilmiş eksploratris timpanotomi ameliyatı yeterlidir. İkinci bakı için tekrar eksplorasyon gerekli değildir. Tip 2'de yaklaşım yine genişletilmiş eksploratris timpanotomi ameliyatı ile yapılır. Ancak attikotomi ve kanal duvarının korunduğu (CWU: canal wall up) timpanomastoidektomi gerekebilir. Bununla birlikte kemikçik zincir onarılabilir ve ikinci bakı için tekrar eksplorasyon gereklidir. Tip 3 lezyonlarda yaklaşım Tip 2 lezyonlardakine benzerdir. Ancak genellikle kanal duvarının indirildiği (CWD: canal wall down) timpanomastoidektomi yapılması gerekir (30).

Edinilmiş kolesteatomun oluşumunda 4 farklı teori ileri sürülmüştür; 1) orta kulak mukozasının enfeksiyona bağlı yassı epitele metaplazisi, 2) bazal keratinositlerin bazal laminayı geçerek kulak zarının lamina propriası içine doğru göç etmeleri, 3) kulak zarındaki bir delik yoluyla epitelin içeriye doğru büyümesi, 4) Östaki disfonksiyonu sonucu kulak zarının pars flaccida bölgesinin retraksiyonu (invagination). Aynı zamanda bu teorilerin kombinasyonlarını içeren teoriler de öne sürülmüştür (2,3).

Skuamöz metaplazi teorisi:

Bu teorinin en önemli savunucularından birisi Sadé'dir. Sadé'ye göre pluripotent orta kulak epiteli inflamasyonun etkisi ile keratinizasyon gösteren çok katlı yassı epitele metaplazi gösterebilir. Metaplazik epitel, keratin debris birikimi sonucu proliferer olur. Tekrarlayan inflamasyon ve enfeksiyonun neden olduğu lizis, kulak zarında perforasyona neden olmakta ve bu da attik kolesteatomunun ortaya çıkması ile sonuçlanmaktadır. Bu teori effüzyonlu otitis mediası olan çocukluk yaş gurubundaki hastaların orta kulak mukoza biyopsilerinde keratinize epitel adalarının gösterilmesi ile desteklenmiştir. (3,33).

Bazal hiperplazi teorisi:

Kulak zarının çok katlı epitelinde bulunan keratinositlerin, bazal laminayı psödopotlar yardımı ile delerek lamina propriaya geçmesi ve sonrasında da kolesteatom oluşturması temeline dayanan bir teoridir. Genellikle enfeksiyon nedeniyle oluşan inflamatuvar reaksiyonlar sonucunda çok katlı yassı epitelin bazal tabakasında açıklıklar oluşmakta ve bu açıklıklardan geçen keratinositler kolesteatom oluşumuna yol açmaktadır. Bu inflamatuvar süreçlerin çocukluk çağında geçirilen seröz otitler sırasında makroskopik olarak sağlam görünen kulak zarında gerçekleştiğine inanılmaktadır (3).

Migrasyon teorisi:

Bu teoriye göre kulak zarındaki deliğin kenarlarından orta kulağa geçen yassı epitel kolesteatoma neden olmaktadır. Kulak zarında kalıcı bir perforasyon olduğunda, kulak zarının dış yüzündeki yassı epitel pars tensada kulak zarının medial yüzeyindeki kolumnar epitel ile temas etmek üzere iç yüzeye doğru göç eder. Temas gerçekleştiğinde kontakt inhibisyonla normalde süreç sonlanmaktadır. Bazal membran sağlam olarak kalmakta ve kulak zarının iç yüzeyine dönen epidermisin ürettiği keratin dışarı doğru atılmaya devam etmektedir. Bu teoriye göre perforasyon sonrası oluşan enfeksiyon kontakt inhibisyona engel olmakta ve içeri dönmüş olan epidermis orta kulağa doğru çoğalmaya devam ederek kolesteatom oluşumuna neden olmaktadır (3,34).

Retraksiyon cebi ya da invajinasyon teorisi:

Bu teoriye göre kulak zarının pars flaccida ya da pars tensa bölgesi orta kulağa doğru retrakte olmaktadır. Retraksiyon cebinin oluşması, orta kulak negatif basıncı ve inflamasyonun tek tek ya da birlikte etkisi sonucu olur. Retraksiyon cebinde keratin birikimi, eklenen inflamasyon ve cebin kendi kendini temizleyememesi sonucunda kolesteatom oluşmaktadır. Kim ve Chole yaptıkları çalışmada östaki disfonksiyonu oluşturulan hayvan modelinde retraksiyon cebi ve kolesteatom oluşumunu göstermişlerdir (3,35).

Oluşan retraksiyon ceplerinin bir kısmının kolesteatom oluşumu ile sonuçlanırken bir kısmının ise neden hiçbir değişiklik göstermediği sorusu halen cevap bulamamıştır. Sudhoff ve Tos yayınladıkları makalelerinde, retraksiyon ceplerinden kolesteatom oluşumunda bazal hiperplazi ile invajinasyonun birlikte etki ettiğini öne sürmüşlerdir. Bu çalışmada retraksiyon cebinden kolesteatom oluşumunun 4 aşamada gerçekleştiği bildirilmiştir. İlk aşama retraksiyon cebi aşamasıdır. İkinci olarak retraksiyon cebinin çoğalma aşaması gerçekleşir. Üçüncü aşamada retraksiyon cebinin genişlemesi ve kolesteatom oluşumu gerçekleşir. Son olarak da kemik rezorbsiyonu oluşur (36,37).

Sudhoff ve Tos orta kulak kolesteatomu olan hastalardan alınan örneklerde proliferasyon göstergesi olarak Ki-67 antijen düzeyine (MIB-1 antikoru ile) ve bazal tabaka bütünlüğünü tespit etmek amacıyla da tip-4 kollajenin boyanma durumuna bakarak elde ettikleri sonuçları kontrol grubu olarak kullanılan DKY cildi ile karşılaştırmışlardır. Kolesteatom matriksinde daha yüksek hücre proliferasyonu tespit edilmiştir. Tip-4 kollajen için ise DKY’de her hangi bir devamsızlık gözlenmezken, kolesteatom örneklerinde bazal

tabakada yer yer devamsızlıklar bulunduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgulara göre, retraksiyon ceplerinde hücre proliferasyonu artmakta artan epitel hücreleri bazal tabakada tip-4 kollajenin devamlılığının bozulduğu alanlardan subepitelyal tabakalara invazyon göstermekte ve sonraki aşamalarda kolesteatom oluşmaktadır (36).

Birincil edinilmiş kolesteatom (attik retraksiyon cebi kolesteatomu) patogenezi:

Birincil edinilmiş kolesteatom (attik retraksiyon cebi kolesteatomu) patogenezinde günümüzde en çok kabul gören teori invajinasyon teorisi. Östaki disfonksiyonuna yol açan anatomik ve patolojik koşullar, orta kulak boşluğunda negatif basınç oluşmasına yol açar. Oluşan negatif basınç kulak zarında bir zayıflık oluşturur ve retraksiyon cebi oluşumuna yol açar. Pars flaccida bölgesi kulak zarının yapısal olarak en zayıf bölgesi olduğu için retraksiyon cepleri en fazla bu bölgede oluşmaktadır. Oluşan tüm retraksiyon cepleri kolesteatom oluşumu ile sonuçlanmamaktadır. Retraksiyon cebindeki epitelin migrasyon özelliğinde bozukluk oluşması ve çoğalmaya devam etmesi sonucunda keratin debrisler birikir. Biriken bu keratin debrislerin temizlenememesi, retraksiyonun derinleşmesine ve daha fazla keratin debrisin birikmesine yol açar. Biriken keratin debrislerde zaman içerisinde bakteriyel proliferasyon gerçekleşir. Bu süperenfeksiyonlar bir biofilm tabakası oluşumuna yol açar ve oluşan biofilm tabakası da kronik enfeksiyon ve epitel çoğalmasını tetikler. Biofilm bakterilerin doğada genellikle bulundukları mikrobiyal topluluklara verilen isimdir. Biofilm tabakası bakterileri uygun olmayan çevre koşullarından korumaktadır. Koşulların uygun olması ile birlikte bu bakteriler tekrar aktif hale geçerek çoğalmaktadır. Polisakkarit bir matriks ile kaplı olan bu bakteriler antibiyotiklere karşı da dirençlidirler. Kolesteatoma eşlik eden dirençli ve kronik enfeksiyon da biofilm varlığı ile açıklanmaktadır. Chole ve Faddis, insanlarda kolesteatom matriksinden aldıkları örneklerde ve deneysel olarak hayvanlarda oluşturulan kolesteatom örneklerinde biofilm tabakasının varlığını kanıtlamışlardır. Biofilm tabakasındaki bakterilerin dönem dönem aktif hale geçerek enfeksiyona neden olmasının yanı sıra, biofilm tabakasındaki inaktif bakterilerin üretmeye devam ettiği endotoksin gibi maddeler de konakta kronik inflamasyona, epitel proliferasyonuna ve kemik yıkımına yol açmaktadır (2,3,38,39).

İkincil edinilmiş kolesteatom patogenezi:

İkincil edinilmiş kolesteatom, kulak zarı çok katlı yassı epitelinin, orta kulağa marjinal bir perforasyondan geçmesi (migrasyon) ya da orta kulak boşluğuna

keratinositlerin herhangi bir şekilde ekilmesi (implantasyon) sonucunda oluşur. İmplantasyon temporal kemik travması ile şiddetli patlamalar sonrası ya da cerrahi işlemler sırasında iatrojenik olarak gerçekleşebilir (2).

Tüm kolesteatom türleri için öne sürülen teorilerle ilgili deneysel ve klinik kanıtlar bulunmakla birlikte, hiçbir teori için kesinleşmiş net bir kanıt yoktur. Bununla birlikte hangi grupta sınıflandırılırsa sınıflandırılınsın tüm kolesteatomlar benzer özellikler gösterir. Bu özellikler invazyon, migrasyon, artmış proliferasyon, değişmiş hücre farklılaşma özellikleri, saldırgan büyüme ve hastalığın tekrarlama eğilimidir (3).

Gerek kazanılmış gerekse konjenital kolesteatomların patogenezi ile ilgili temelde cevaplandırılması gereken iki soru vardır; keratinize yassı epitelin nereden kaynaklandığı ve epidermin aşırı proliferasyon göstermesini ve invaziv karakterini hangi faktörlerin etkilediği. Kolesteatom büyüme kontrol bozukluğu ile karakterize bir hastalık olarak tanımlanabilir. Bu büyüme kontrol bozukluğunun nedeni olarak ise kolesteatomu oluşturan yassı epitelin DKY ve kulak zarındaki yassı epitelden farklı karakterlere sahip olması ve kolesteatom epitelindeki büyüme kontrol mekanizmalarının bozulması suçlanmaktadır (3). Literatürde kolesteatom epitelinin özelliklerini ortaya koymak için DKY cildi ya da retroauriküler cildin kontrol grubu olarak kullanıldığı pek çok çalışma yapılmıştır. Kolesteatom epitelinin hiperproliferatif özelliklerini ortaya koymak için en sık kullanılan ve en güvenilir belirteç Ki-67 antijenidir. Sudhoff ve ark. yaptıkları çalışmada kolesteatom örneklerinde Ki-67 skorunu dış kulak cildine göre 2.3 kat daha fazla bulmuşlardır. Kolesteatomun proliferatif aktivitesini belirlemek için kullanılmış olan diğer belirteçler ise sitokeratin 13/16, PCNA ve trombomodulindir (3,40,41).

Yapılan çalışmalar sonucunda kolesteatomun hiperproliferatif karakterinin ortaya konması ile birlikte düşük gradeli bir tümör olabileceği öne sürülmüştür. Desloge ve ark. yapmış oldukları çalışmada kolesteatom örnekleri ile postauriküler bölge cildinden aldıkları örnekleri DNA içeriği açısından karşılaştırmışlardır. İncelenen örneklerin hemen hemen tamamında normal öploid hücre içeriği tespit edilmiştir. Sonuç olarak kolesteatomun düşük dereceli bir tümör olmadığı sonucuna varılmıştır (42). Ancak literatürde kolesteatom epitel hücrelerinde anöploid sıklığının fazla olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Lavezzi ve ark. inceledikleri kolesteatom örneklerinin %52'sinde trizomi 7 varlığını göstermişler ve kolesteatomun hiperproliferatif özelliğini, epidermal büyüme faktörü reseptör (Epidermal growth factor receptor, EGF-R) geninin 7. kromozomda bulunması ve bu genin fazla ekspresyonu ile açıklamışlardır (43). Bununla

birlikte, kolesteatomda meydana gelen genetik değişikliklerin kromozomal düzeyde değil gen düzeyinde olduğu düşünölmektedir.

Tokuriki ve arkadaşları çalışmalarında kolesteatom dokusunda ve postauriküler cilt örneklerinde artışa uğrayan ve azalan genleri araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre kolesteatom dokusunda, hücre çoğalması ve farklılaşması ile ilişkili genler olan calgranulin A, calgranulin B, psoriasin, timosin β 10 ve invazyon ile ilgili genler olan katepsin C, katepsin D ve katepsin H düzeylerinde artış olduğu saptanmıştır. Katepsinler intrasellöler ve ekstrasellöler proteinlerin yıkımında rol oynayan lizozomal proteazlardır. Kolesteatom patogeneğinde de bazal membranın yıkılmasında rol oynadıkları düşünölmektedir. Bu çalışmada tespit edilmiş olan gen ürünlerindeki artış, kolesteatomda aşırı keratin üretimine neden olan keratinosit farklılaşmasındaki ve migrasyonundaki değişikliklerin bir nedeni olarak gösterilmektedir (44). Kwon ve ark. oligonökleotid mikroarray yöntemi ile 10115 genin kolesteatom epitelindeki salınımını incelemişlerdir. 1327 gende artmış salınım tespit edilirken 767 gende ise azalmış salınım tespit edilmiştir. Kolesteatom patogenezi ile ilgili olduğu düşünölen 21 gen tekrar ters transkriptaz-PCR (Polymerase chain reaction) yöntemi ile incelenmiş ve artmış gen salınımı teyit edilmiştir (45).

Kolesteatomda, normalde keratinositlerde görölen hücre proliferasyonu ve programlanmış hücre ölümlü arasındaki denge bozulmuştur. Hücre ölümlü ve hücre canlılığı, hücre ölümlü inhibitörleri ve stimölatörlerinden oluşın geniş bir gen ailesinin aktivitelerinin değerlendirilmesi ile tespit edilir (9).

Tümör supresör genlerle ilgili yapılan çalışmalarda kolesteatomda p53 geninin postauriküler cilde göre 9 ile 20 kat artmış salınımının olduğu gösterilmiştir (46). p53, hücre siklusu kontrolünde en önemli genlerden birisidir. p53 gen ürünleri hücre çoğalmasının kontrol edilmesinde, hücre farklılaşmasında ve programlanmış hücre ölümlünde rol oynarlar. Artın p53 gen proteinleri salınımının kolesteatomda çoğalması artmış olan değişime uğramış hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını engellediği düşünölmektedir (2,3,46).

Kolesteatomda çalışılan genlerden birisi de c-myc onkogenidir. c-myc 8q24 kromozomunda yerleşik, hücre çoğalmasının kontrolünde, hücre farklılaşmasında ve apoptoziste rol oynayan bir gendir (47,48). Holly ve ark. yaptıkları çalışmada c-myc geninin kolesteatomda DKY cildine göre artmış salınım gösterdiğini kanıtlamışlardır (49).

Ozturk ve ark. ise, birincil edinilmiş kolesteatomda c-myc geninin yerleşim gösterdiği 8. kromozom anöploidisi ve c-myc kopya sayısında artış olduğunu göstermişlerdir (48).

Kolesteatomda artmış olan hücre proliferasyonu beraberinde artmış hücre ölümünü (apoptozis) getirmektedir. Bu ise keratin debris birikimi ile sonuçlanmaktadır (2,3,50,51). Miyazaki ve ark. kolesteatom epitelindeki terminal farklılaşma ve apoptozis süreçlerinin normal cilt ile benzer olduğunu belirtmişlerdir. Keratin debrislerinin birikimine neden olan faktörün ise artmış olan proliferasyonu dengelemek için artan apoptozis olduğunu savunmaktadırlar (52). Kojima ve ark. ise kolesteatomdaki keratinositlerin çoğalmasının malign tümörlerdeki gibi kontrolsüz olmadığını, çoğalan ve apoptozise uğrayan hücrelerin sadece sayılarında artış olduğunu belirtmektedirler (53). Bununla birlikte, artmış apoptotik indeksi olan kolesteatomların tekrarlama eğiliminin daha fazla olduğu öne sürülmektedir (54).

Kolesteatom epitelinin hiperproliferatif ve invaziv karakterini ortaya koymak için en fazla incelenen belirteçler sitokeratinler ve farklılaşma belirteçleridir. Sitokeratinler (SK) 30 kadar farklı proteinden oluşan epitel kaynaklı intermediate flamanlardır. Sitokeratinlerin epiteldeki dağılımları hücrenin tipine, büyümesine, migrasyonuna ve farklılaşma basamağına göre değişiklik göstermektedir. İnflamatuvar hastalıklarda sitokeratinler hücreler arasında mesaj iletimini sağlamaktadırlar. Olszewska ve Sudhoff yaptıkları bir çalışmada kolesteatom epitelinde sitokeratin dağılımını incelemişlerdir. Buna göre SK-10, SK-34ßE12 ve SK-14 kolesteatom epitelinde ve DKY cildinde yoğun olarak gözlenirken, orta kulak mukozasında gözlenmemiştir. SK-10, SK-34ßE12 epitelin artmış farklılaşmasına ve keratin üretimine işaret eden belirteçlerdir. SK-19 ve SK-4 ise glandüler hücrelerde ve orta kulak mukozasında artmış salınım göstermişlerdir ve keratinize olmayan epitel için bir belirteç olarak kullanılabilirler. Sonuç olarak SK-10 ve SK-4 kolesteatom patogenezinde terminal farklılaşmanın tespitinde kullanılabilecek olan belirteçlerdir. Bu sitokeratinlerin düzenlenmesinde rol oynayan faktörlerin belirlenmesi ile kolesteatom gibi hiperproliferatif özellikteki hastalıkların tedavisinde yeni açılımların gündeme gelmesi umulmaktadır (55). Konjenital kolesteatom ile kazanılmış kolesteatomda sitokeratin salınım özelliklerini karşılaştırmak için yapılan bir çalışmada ise SK-10, SK-14, SK-18, SK-19 ve SK-34ßE12 salınımı açısından bir fark tespit edilmemiştir (11).

Kolesteatom etyopatogenezinde büyüme faktörleri ve sitokinlerin rolleri ile ilgili olarak da literatürde pek çok çalışma vardır. Normal epidermiste keratinosit çoğalmasının bazal tabakada sınırlı kalması, transformasyonu sağlayan büyüme faktörü – alfa

(transforming growth factor-alfa, TGF-alfa) ve epidermal büyüme faktörünün (epidermal growth factor, EGF) lokal salınımı ve epidermal büyüme faktörü reseptörünün (epidermal growth factor receptor, EGF-R) suprabazal tabakalarda salınımının azaltılması ile kontrol edilmektedir. Kolesteatomda ise EGF-R sistemine ait regülasyon bozuklukları ve EGF-R'nin artmış salınımı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Benzer bulgular keratinosit büyüme faktörü reseptörü (keratinocyte growth factor receptor, KGF-R) için de tespit edilmiştir (3,56-60).

Kolesteatom epitelinin normal dışı fonksiyonlar göstermesinde kolesteatoma eşlik eden inflamasyon dokusundaki immün sistem hücrelerinden salgılanan sitokinler ve büyüme faktörleri de sorumlu tutulmaktadır. Yapılan çalışmalarda kolesteatom dokusunu çevreleyen stromada artmış makrofaj ve lenfosit sayıları ile birlikte interlökin-1 (IL-1), TGF-alfa düzeylerinde artış tespit edilmiştir (58). Yine lenfositler arasında ve lenfositlerle diğer hücreler arasında iletişimde önemli rol oynayan intersellüler adezyon molekülü-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) ve intersellüler adezyon molekülü-2 (intercellular adhesion molecule-2, ICAM-2) düzeyleri kolesteatom dokusunda yüksek bulunmuştur. Bu moleküllerin kolesteatomdaki inflamatuvar olaylarda merkezi rol oynadığı belirtilmektedir (61). İnflamasyon kolesteatomda her zaman için izlenen bir bulgudur. İnflamasyon vücutta doku hasarına karşı gelişen normal bir immün cevaptır. Hasarlanan dokunun tamir edilmesi ve fonksiyonlarını tekrar kazanması için gereklidir. İnflamatuar cevap akut olabileceği gibi, kolesteatomda olduğu gibi kronik de olabilmektedir. Kolesteatom stromasının aktive olmuş T-lenfositler ve makrofajlar tarafından infiltrasyonu bu kronik inflamatuvar cevabın kanıtıdır (3,62). Ottaviani ve ark. kolesteatom dokusunda immün sistemin oynadığı rolü değerlendirmek amacıyla kolesteatom ile psöriazisin benzer özelliklerinden yola çıkmışlardır. Psöriazis de kolesteatom gibi hücre çoğalması ve inflamasyonun izlendiği bir hastalıktır. Bu nedenle psöriaziste daha önce araştırılmış sitokinlere ve adezyon moleküllerine kolesteatom dokusunun matriks ve perimatriksinde tekrar bakmışlardır. Bu çalışmada kolesteatom dokusunun perimatriks tabakasında T-helper hücreler (CD4+), plazma hücreleri, dağınık olarak bulunan T-süpressör hücreler (CD8+) ve B-hücreleri ile birlikte özellikle epitele yakın bölgelerde mast hücreleri tespit edilmiştir. ICAM-1 ve endotel kaynaklı lökosit adezyon molekülü-1 (endothelial derived leukocyte adhesion molecule-1, ELAM-1) inflamatuvar hücrelerin toplanmasında ve immün cevabın düzenlenmesinde fonksiyon görür. Perimatriksdeki endotelial dokunun ICAM-1 ve ELAM-1 ile yoğun boyandığı tespit edilmiştir. Yine interferon-gamma reseptörünün

(IFN-gammaR) ve EGF-R'nin kolestatom matriksinde yoğun boyanma gösterdiği tespit edilmiştir. İnterlökkin-4 (IL-4) ve IL-4 reseptörü, interlökkin-10 (IL-10) ve IL-10 reseptörünün ise kolestatom matriksinde olmadığı tespit edilmiştir. Bu bulgu ise T-helper1 lenfosit subpopülasyonunun kolestatomdaki inflamatuvar reaksiyonlarda daha baskın rol oynadığını göstermektedir (63).

Ekstrasellüler matriksin bileşenleri olan kollajen, fibronektin, integrinler ve glikozaminoglikanlar adezyon, hücre migrasyonu, çoğalması ve farklılaşmasında çeşitli roller üstlenmektedir. Tip-4 kollajen bazal membranın temel yapı taşı oluştururken, fibronektin ise yara iyileşmesinde rol oynayan önemli bir glikoproteindir. Kolestatomda inflamasyona bağlı olarak ortaya çıkan uyarılar yara iyileşmesi sırasında organizmada gerçekleşen olaylar zincirini tetiklemektedir. Kolestatomda inflamasyonun sürekli olarak varlığını koruması beraberinde yara iyileşmesinin de süreklilik kazanmasına ve fibroblast ve epitelyal hücrelerde proliferasyona neden olmaktadır (3). Huisman ve ark. yara iyileşmesinde kritik bir rolü olan transforme edici büyüme faktörü-beta (transforming growth factor-beta, TGF-Bbeta) düzeylerinin kolestatom ekstrasellüler matriksinde artmış olduğunu tespit etmişlerdir (64). Sudhoff ve ark. ise yapmış oldukları çalışmada kolestatom bazal tabakasında kollajen tip-4, kollajen tip-7 ve fibronektin dağılımını DKY cildi ile karşılaştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre kollajen tip-4 normal deride lineer bir dağılım ve devamlılık gösterirken, kolestatomda tip-4 kollajenin devamlılığında bölgesel bozulmalar tespit edilmiştir. Bu devamsızlıkların özellikle inflamasyonun yoğun izlendiği örneklerde daha belirgin olduğu belirtilmektedir. Tip-7 kollajen dağılımında bir değişiklik tespit edilmezken, kolestatom dokusunda fibronektinin deriye göre daha yoğun boyandığı tespit edilmiştir (65). Parisier ve ark. ise yapmış oldukları çalışmada in vitro hücre kültürlerinde kolestatom örneklerinden elde edilen fibroblastların, postauriküler bölgede elde edilen fibroblastlara göre bazal membranı daha fazla invaze etme potansiyelinde oldukları sonucuna varmışlardır (66).

Anjiyogenezis yeni kan damarlarının oluşumunu ifade etmektedir. Gerek yara iyileşmesi süreci gerekse inflamasyon beraberinde artmış anjiyogenezisi getirir. Sudhoff ve ark. yapmış oldukları çalışmada kolestatom dokusunda anjiyogenezis ile ilişkili olan fibroblast büyüme faktörü-2 (fibroblast growth factor-2, FGF-2), TGF-alfa, TGF-beta1 ve vasküler endotel büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor, VEGF) düzeyleri ile kolestatomdaki vaskülarizasyonun özelliklerini araştırmışlardır. Bu çalışmada perimatrikste vaskülarizasyonun, orta kulak mukozasına göre 4.3 kat, DKY cildine göre ise

2 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. İncelenen büyüme faktörlerinin ise dağılım ve üretiminde değişiklikler tespit etmişlerdir (67). Gerek kolesteatom dokusundaki keratinositlerin, gerekse inflamatuvar dokudaki lökositlerin anjiogenetik faktörler salgıladıkları bilinmektedir ve kolesteatom dokusundaki endotel hücrelerinin çoğalmasından her iki faktör de sorumlu tutulmaktadır (3).

Kolesteatomlu kronik otitin klinik özellikleri arasında yer alan iletim tipi işitme kaybının derecesi, kolesteatomun yaygınlığı ve kemik yıkımının derecesi, çalışmalarda kullanılan klinik değişkenlerdir (14). Doğumsal ya da edinilmiş olsun, kolesteatomlar enfeksiyonlara karşı artmış duyarlılık, saldırgan büyüme ve bölgesel genişleme gibi özellikleri sonucu kemik erimesine yol açma potansiyeline sahiptir. Kolesteatomda kemik yıkımı ile ilgili olarak iki temel mekanizmadan bahsedilebilir. Bunlardan ilki basınç etkisi ile kemik yıkımı, ikincisi ise inflamasyonun etkisi ile salınan sitokinlerin aktive ettiği enzimlerin neden olduğu kemik yıkımıdır. Chole ve ark. hayvan modellerinde orta kulağa yerleştirdikleri silikon şeritlerin neden olduğu basınç etkisi ile kolesteatom olmaksızın da kemik yıkımı olabileceğini göstermişlerdir. Kronik inflamasyonda salgılanan sitokinler (IL-1, IL-6, TNF), prostoglandinler, nitrik oksit, büyüme faktörleri ve nörotransmitterler gibi inflamatuvar mediatörlerin osteoklastları uyarak kemik erimesine neden olduğu da belirtilmektedir (2,68,69). Normal kemik dokusunda kemik yapımını sağlayan osteoblastlar ve kemik yıkımına neden olan osteoklastlar denge halinde çalışır. Kemik yıkımı birbirini takip eden bir dizi olaylar zinciri sonrası ortaya çıkmaktadır. Öncelikle kemik iliğinden kaynaklanan mononükleer hücrelerin toplanması ve çok çekirdekli osteoklastlar haline gelmesi gerekmektedir. Kolesteatomda bu süreç yerel basınç ve salgılanan inflamatuvar mediatörlerin etkisi ile gerçekleşir. Osteoklastlar ise araziidonik asit metabolitleri başta olmak üzere salgıladıkları sitokinlerle kemik yıkımına neden olur (3). Cinamon ve ark. yaptıkları çalışmada kolesteatoma komşu kemik yapıların periostunda devamsızlıklar ve düzensizlikler tespit etmişlerdir. Yine kolesteatoma komşu kemik yapılarda osteoblastlarda azalma tespit edilmiştir (70). Suziki ve Ohtani ise iki hastada kolesteatom kesesinin rüptürüne bağlı bölgesel inflamasyon ve osteolizis gözlemlemişlerdir (71).

Proteazların kemik yıkımında oynadıkları rolü tespit etmek amacıyla yapılan çalışmalarda matriks metalloproteinaz (MMP)-2 ve MMP-9'un bazal membrandaki tip-4 kollajenin yıkımına neden olarak kemik dokunun yeniden yapılandırılmasında rol oynayabilecekleri düşünülmüştür. Schmidt ve ark. yapmış oldukları çalışmada MMP-9'un

kolesteatom dokusunda artmış salınım gösterdiğini tespit ederken benzer bulguları MMP-2 için elde edememişlerdir. Aynı yazarlar yapmış oldukları başka bir çalışmada ise artan MMP-9 düzeyleri ile inceledikleri sitokin ve büyüme faktörlerinin (IL-1alfa, IL1-beta, TNF-alfa, TGF-beta, EGF) düzeylerindeki artış arasında korelasyon olmadığını tespit etmişlerdir (72,73). Mehta ve ark. ise çalışmalarında MMP-8 ve MMP-13 düzeylerinin kolesteatomda artmış olduğunu tespit etmişlerdir (74). Kolesteatomdaki kemik yıkımın önüne geçmek amacıyla, osteoporoz tedavisinde de kullanılan bir ilaç grubu olan bifosfonatlarla ilgili hayvan deneyleri mevcuttur (75,76). Ancak bu çalışmalardan elde edilen sonuçların kliniğe uygulanabilirliği günümüz için olanaklı görünmemektedir.

c. Tedavi:

Kolesteatom tedavisi cerrahi olan bir hastalıktır. Cerrahide temel amaç yassı epiteli tamamen temizleyerek rekürrens ihtimalini ortadan kaldırmaktır. Kolesteatom cerrahi olarak tedavi edilmediğinde potansiyel olarak ölümcül sonuçlar doğurabilecek bir hastalıktır. Dolayısı ile işitme gibi fonksiyonel beklentiler, hastalığın ortadan kaldırılması söz konusu olduğunda ikinci plana bırakılabilir (17).

Kolesteatom cerrahisinde kullanılan cerrahi teknikler, temelde açık teknik (DKY arka kemik duvarının korunmadığı teknikler) ve kapalı teknik (DKY arka kemik duvarının korunduğu ya da onarıldığı teknikler) olmak üzere iki başlık altında toplanır. Hangi tekniğin kullanılacağına temelde kolesteatomun yerleşimine ve yaygınlığına göre karar verilir. Mastoid havalanmasının iyi olduğu, östaki fonksiyonunun iyi olduğu, kolesteatom yaygınlığının fazla olmadığı hastalarda, çocukluk yaş grubundaki hastalarda ve ikinci kez operasyon şansının olduğu takip edilebilecek hasta grubunda kapalı teknikler tercih edilirken, bu kriterlere uymayan hasta gruplarında daha çok açık teknikler tercih edilmektedir (17,34,77).

Son yarım yüzyıldır hangi cerrahi işlemin, hangi koşullarda uygulanacağı ile ilgili tartışmalar otolojide geniş yer tutmuştur. Kanal duvarının indirildiği (açık teknik-CWD) tekniklerin en önemli avantajı iyi bir görüş açısı sağlaması ve epitimpanium ve mezotimpaniuma daha kolay müdahale edilmesine olanak sağlamasıdır. Dolayısı ile tek aşamada bu bölgelerdeki hastalığın temizlenmesine ve kemikçik zincir rekonstrüksiyonunun aynı işlem sırasında gerçekleştirilmesine olanak verir. Aynı zamanda geniş görüş alanı sağladığı için kapalı tekniğe (kanal duvarının korunduğu teknik-CWU) göre daha düşük rekürrens oranları bildirilmektedir. Uzun süre belirli aralıklarla hastanın takip edilmesi,

kavite temizliği gerektirmesi ve iyileşme süresinin uzun olması ise açık tekniğın dezavantajlarıdır. Açık teknikte kavitenin epitelize olması için ve postoperatif dönemde kolay takip edilebilmesi için geniş bir meatoplasti gereklidir (17,77).

Kapalı teknikte ise normal anatomi korunduğu için daha hızlı bir iyileşme gözlenir. Düzenli kavite temizliği gerektirmesi gibi dezavantajları yoktur ve işitme sonuçlarının açık tekniğe göre daha iyi olduğu bildirilmektedir. Ancak cerrahi sırasında görüş alanının kısıtlı olması rekürren ve rezidüel hastalık riskini arttırmaktadır. Palva her cerrahın kendisi için daha uygun olduğunu düşündüğu cerrahi tekniğı kullanması gerektiğini ve 5 yıllık takipler sonucunda elde edilen rekürrens oranlarının %10'un altında olması halinde ise kullanılan tekniğın uygun olduğuna karar verilebileceğini bildirmektedir (17,34,77).

Hildmann ve arkadaşları karşılaştıkları kolesteatom olgularının yaklaşık %40'ını kapalı teknik ile ameliyat ettiklerini bildirmektedir. Yüzde 60 olguda ise tercih edilen yöntem açık tekniktir (17). Syms ve Luxford ise hastalarının %68.5'ini kapalı (CWU) teknikle ameliyat ettiklerini, bu hastaların %26.9'unun rezidüel hastalık nedeniyle ikinci kez ameliyat edildiğini, %2.7 hastada ise üçüncü kez ameliyat gerektiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlara dayanarak da planlanmış iki aşamalı CWU tekniğın kolesteatom cerrahisi için uygun seçenek olduğunu savunmaktadırlar (78).

Dornhoffer kullandığı retrograd mastoidektomi tekniğinde, kanal duvarının indirildiğı (CWD) mastoidektomide olduğu gibi dış kulak yolu arka kemik duvarını almakta, böylelikle epitimpanyuma ve üst mezotimpanyuma CWD tekniklerdeki gibi hakim olarak görüş alanını arttırmakta ve kolesteatom temizlendikten sonra da dış kulak yolu arka kemik duvarını kavum simbadan aldığı kıkırdak ile rekonstrükte etmektedir. Retrograd mastoidektomi uygulanan hastaların rekürrens oranlarının uzun süreli takiplerde CWD tekniklerde bildirilen oranlar ile benzer şekilde düşük olduğunu ifade etmektedir. Retrograd mastoidektomi uygulanan hastalarda ikinci bir cerrahi gereksiniminin başlıca nedeni olarak ise sinüs timpaniden hastalığın yeterince temizlenememesi olarak gösterilmektedir (79).

CWD timpanomastoidektomiden sonra kalıcı otoreden kaçınmak ve mastoidektomi defektinin iyileşmesini arttırmak amacıyla mastoid kavitenin oblitere edilerek küçültülmesi gerekebilir. Aynı zamanda cerrahi sonrası oluşturulan büyük mastoid kavitelerde karşılaşılabilecek işitme cihazı kullanımında güçlük, sıcak ya da soğuk hava veya su ile kalorik uyarım sonucu ortaya çıkan baş dönmesi ve büyük kavitelerin temizlenme güçlüğü

gibi sorunların da mastoid kavite obliterasyonu ile mastoid kavitenin küçültülmesi ile giderilebileceği ifade edilmektedir. Obliterasyon için bölgesel flepler (Palva flebi, temporal kas flebi gibi) çevrilebileceği gibi; kemik, kemik talaş, yağ, kıkırdak fasya ve hidroksiapatit materyal de kullanılmaktadır (80).

Kolesteatom cerrahisinde kulak zarı onarımında kullanılan greft materyalleri diğer kulak ameliyatlarındaki ile aynıdır. Kullanılan başlıca greft materyalleri temporal fasya, perikondrium ve kıkırdaktır. En sık kullanılan greft materyali temporal kas fasyasıdır. Başlıca avantajları cerrahi saha içerisinde olduğu için kolay elde edilebilir olması, istenilen büyüklükte elde edilebilmesi ve uygulama sırasında kolay manipüle edilebilmesidir. Aynı zamanda elde edilen fasya mastoid kavitenin oblitere edilmesinde de kullanılabilir. Perikondrium fasyaya göre daha sağlam bir greft materyali olmakla birlikte zar bakiyesine adezyonu daha zayıftır. Cerrahi sahadan tragal ya da konkal kartilajdan elde edilebilir. Bir diğer dezavantajı da greft materyalinin sınırlı miktarda elde edilebilmesidir. Kıkırdak greft ise perikondriumla birlikte ya da tek başına kullanılabilir. Kıkırdak greftlerin sağlam yapıları nedeniyle östaki disfonksiyonu olan hastalarda retraksiyona karşı daha dirençli olduğu ileri sürülmektedir. Potansiyel dezavantajları ise kalın bir greft materyali olduğu için vibrasyon göstermemesi nedeniyle ses iletiminin kötü olması ve postoperatif dönemde orta kulaktaki rekürrens ve rezidü kolesteatom dokusunun izlenmesine engel olmasıdır. Ancak literatürde kıkırdak greftlerle elde edilen işitme sonuçlarının daha kötü olduğuna dair kanıt bulunmamaktadır. Bununla birlikte kıkırdağın vibrasyon özelliğini arttırmak amacıyla kondroperikondrial ada greftleri ve kıkırdak palizad tekniğın kullanılması önerilmektedir (17,77,81).

Kemikçik zincir rekonstrüksiyonu:

Tüm kronik orta kulak enfeksiyonlarında kemikçik zincir bütünlüğünde bozulmalar izlenebilir. Bununla birlikte kolesteatom kemikçik zincirde erozyona yol açan en sık kronik kulak patolojisidir. Kemikçik zincir defekti inkus lentiküler prosesinde erozyon, inkusun distal kısmında ve uzun kolunda erozyon, stapeste erozyon gibi nedenlere bağlı olarak gelişebileceği gibi, kolesteatomun çıkarılması için kemikçiklerin de çıkarılmasının gerektiği durumlara bağlı olarak da görülebilir (82).

Kemikçik zincir rekonstrüksiyonu için otogreft, homogreft ve allogreftler kullanılabilir. Otogreft olarak hastanın kendi kıkırdağı ya da kemikçikleri kullanılabilir. Kemikçik zincir rekonstrüksiyonunda hastanın kendisinden elde edilen (otogreft)

kemikçikler kullanılabilecek durumdaysa öncelikle tercih edilmektedir. Bu amaçla en sık inkus interpozisyon grefti kullanılmaktadır. Otogreftlerin avantajları kolay elde edilmeleri, vücuda uyum sorununun olmaması, maliyetlerinin olmaması ve düşük atılım göstermeleridir. Kolesteatomlu hastalarda olası hastalık tekrarına neden olabilecekleri iddiası ve orta kulak kemik yapıları ile fiksasyon gösterebilmeleri ise başlıca dezavantajlarıdır. Başka hastalardan elde edilen ve formaldehitte saklanan homogreftler, kemiğin antijenik özellikleri düşük olduğu için kullanılabilmektedir. Ancak kemikçik bankada saklanan homogreftlerin HIV, Creutzfeldt-Jacob hastalığı gibi hastalıkların bulaştırılmasında potansiyel risk taşıdığı belirtilmektedir. Büyük merkezler dışında kemikçik banka oluşturulmasının güçlüğü bir diğer dezavantajdır. Ancak yüksek sağlık maliyetleri, doğal ve ucuz materyaller olmaları nedeniyle halen tercih edilmelerine neden olmaktadır (34,82,83).

Son 20 yıl içerisinde otolojide allogreft kullanımına artan bir ilgi vardır. Allogreftler temelde TORP (total ossicular replacement prosthesis) ve PORP (partial ossicular replacement prosthesis) olarak iki grupta üretilmektedir. Ossiküloplasti amacıyla kullanılan sentetik materyaller çeşitlilik göstermektedir. Polietilen, politetrafluoroetilen, silikon, paslanmaz çelik, proplast, seravital, bioglass, alüminyum oksit seramik, hidroksiapatit, karbon, titanyum, platin, tantalum ve altın ossiküloplasti amacıyla kullanılmış başlıca sentetik materyallerdir. Allogreftlerle ilgili en önemli sorunlar ise doku uyumluluğu ve protezin atılmasıdır. Hidroksiapatit, kemiğin mineral matriksine benzer özelliklere sahip kalsiyum fosfat bioseramiktir ve vücuda uyumluluğu diğer sentetik materyallere kıyasla daha iyidir. Titanyum protezler ise son yıllarda hidroksiapatit protezler kadar popüler kullanım alanı bulmuştur. Vücut uyumluluğunun yüksek olmasının yanı sıra daha hafif bir madde olması, rijiditesinin daha fazla olması ve üretici firmalar tarafından daha fazla çeşit ve boyutta üretilebiliyor olması, hidroksiapatit protezlere tercih edilmesinin başlıca nedenleridir. Ancak atılımı engellemek için protez ile greft zar arasına kıkırdak yerleştirilmesinin gerekliliği vurgulanmaktadır. Sadece inkudostapedial eklemin devamlılığının bozulduğu durumlar için ise kemik çimento kullanımı, teknik olarak uygulamanın kolay olması ve düşük maliyeti nedeniyle tercih edilebilir (83-85).

Cerrahi komplikasyonlar:

Fasiyal paralizi: Cerrahiye bağlı komplikasyonların en önemlisi, fasiyal sinir hasarıdır. Fasiyal sinir hasarından kaçınmak için cerrahi sırasında sinir monitörizasyonu yapılabilir. Ancak hiçbir önlem fasiyal sinirin anatomisini iyi bilmek kadar önemli

değildir. Fasiyal sinirin hasarlanma ihtimali, cerrahi başvuru noktaları tam olarak tespit edilemeyebileceği için revizyon cerrahisinde ve konjenital kolesteatom vakalarında daha fazladır. Cerrahi sırasında fasiyal sinirde bir hasar olduğu düşünülürse sinir ortaya konmalıdır. Sadece epinöryum ya da sinir kılıfı hasarlanmışsa genellikle kalıcı hasar oluşmaz. Sinirin %40'ından azı hasarlanmışsa ve fasiyal kas kontraksiyonu sinirin proksimal segmentinin uyarımı ile elde ediliyorsa dekompresyon ve kortikosteroid tedavisi yeterlidir. Ancak sinirin %50'den fazlası hasarlanmışsa sinir greftlemesi ile daha iyi sonuçlar elde edilir. Postoperatif dönemde gelişen fasiyal paralizde ise, ilk 4 saat lokal anesteziklerin etkisinin geçmesi için beklenebilir. Ancak bu süresin sonunda fasiyal paralizi devam ediyorsa reeksplorasyon gereklidir (77,86).

İşitme kaybı: Sensörinöral işitme kaybı, kolesteatomun labirent fistülünün üzerinden temizlendiği olgularda, tur ile labirentin ya da kemikçiklerin hasara uğradığı olgularda ortaya çıkabilmektedir. İletim tipi işitme kayıpları ise sensörinöral kayıplara göre daha sık gözlenir ve orta kulak adezyonları, kulak zarı perforasyonu, orta kulak efüzyonları, kemikçik zincir fiksasyonu ve kemikçik zincir rekonstrüksiyonundaki başarısızlıklar gibi pek çok faktöre bağlı olarak ortaya çıkabilir.

Enfeksiyon: Enfeksiyon yara iyileşmesi sırasında ortaya çıkabileceği gibi devam eden kronik kulak hastalığının devamı niteliğinde de olabilmektedir. Mastoidektomiler sonrası enfeksiyon görülme oranı %2-5 arasındadır. Rutin antibiyotik profilaksisinin bu oranı düşürmediği savunulmaktadır. Ancak CWD timpanomastoidektomilerde %1 oranında perikondrit görülmektedir ve perioperatif antibiyotik profilaksisi rutin olarak kullanılmalıdır. Cerrahi sırasında duranın açılması da hastayı menenjit ve beyin apsesi riski ile karşı karşıya bırakabilir.

Baş dönmesi: Labirent fistülü ya da cerrahi sırasında neden olunan hasarlanmalar başdönmesine yol açabilir. Ancak tek taraflı vestibüler fonksiyon kaybına bağlı başdönmesi nadirdir (77).

İntakranial hasarlanmalar: Cerrahi sırasında oluşan dural açıklıklar genellikle nadirdir. Ancak tegmende geniş defekt oluşması, dural abrazyonlar ve beyin omurilik sıvı kaçağı oluşmuş ise kas ya da fasya gibi yumuşak dokularla kapatılarak fibrin yapıştırıcı ile onarılmalıdır. Duranın 1 cm'den daha fazla ortaya çıktığı olgularda oluşan defektin kıkırdak ya da kemik greft ile onarılması gerekir (17,77).

Kanama: Mastoid cerrahi sırasında meydana gelen kanamalar genellikle gelfoam ve bölgesel basınç uygulaması ile durdurulabilecek niteliktedir (77).

d. Komplikasyonlar:

Kronik otitis media orta kulak ve mastoid hücrelerin kalıcı enfeksiyonunu ve inflamasyonunu ifade etmektedir. Orta kulak boşluğu ve mastoid hücrelere komşu olan intratemporal ve intrakranial yapılar bu bölgede ortaya çıkan enfeksiyöz komplikasyonlara açıktır. Akut orta kulak enfeksiyonlarına bağlı gelişen komplikasyonlar daha çok erken yaşlarda görülürken, kronik orta kulak enfeksiyonlarına bağlı gelişen komplikasyonlar daha ileri yaşlarda ortaya çıkmaktadır. Osma ve ark. yapmış oldukları çalışmada, kronik orta kulak enfeksiyonlarına bağlı gelişen komplikasyonların %78'inin kolesteatomlu kronik otit hastalarında ortaya çıktığını belirtmişlerdir (87).

Gerek akut gerekse kronik kulak enfeksiyonlarına bağlı ortaya çıkan komplikasyonlar iki başlık altında incelenir: İntrakranial ve ekstrakranial komplikasyonlar. Ekstrakranial komplikasyonlar da intratemporal ve ekstratemporal komplikasyonlar olarak ikiye ayrılmaktadır (88).

Ekstrakranial komplikasyonlar:

1. Ekstratemporal komplikasyonlar:

Subperiosteal apse:

Kronik otitis medianın en sık görülen ekstratemporal komplikasyonudur. Mastoid hava hücrelerindeki enfeksiyonun subperiosteal alana yayılması sonucu ortaya çıkar. Bu yayılım genellikle mastoid korteksin akut veya koalesan mastoidit kaynaklı erezyonu nedeniyle gerçekleşir. Ancak mastoid venlerin flebiti sonrası da görülebilir. Akut otitis media (AOM) sonrası daha sık ortaya çıkmaktadır. Kolesteatom, aditus ad antrumum tıkayarak enfeksiyöz materyalin drenajına engel olabilir. Bu obstrüksiyon, mastoid korteksin erozyona uğrama ihtimalini artırarak subperiosteal apse ve Bezold apsesi oluşma ihtimalini artırmaktadır. Subperiosteal apsenin tanısı temelde klinik bulgulara dayanır. Yüksek ateş, kırgınlık, aurikulanın laterale ve aşağı itilmesi, postauriküler bölgede fluktuasyon, kızarıklık ve hassasiyet başlıca bulgulardır. Tanının kesinleştirilmesi için kontrastlı BT gerekebilir. BT kesitlerinde apse varlığı ve mastoidde kortikal defekt gözlenir. Klinik olarak subperiosteal apse düşünülen tüm hastalarda kontrastlı BT tetkiki ile basit mastoidit, lenfadenopati, süperfisiyel apse, enfekte sebace kist ve diğer olası komplikasyonların ayırıcı tanısı yapılmalıdır. Kolesteatomlu kronik otite bağlı gelişen

subperiosteal apsenin tedavisi apse drenajı ile birlikte kortikal mastoidektomidir. Sonrasında ise tedaviye intravenöz antibiyotik eklenmelidir (88,89).

Bezold apsesi:

Bezold apsesi subperiosteal apseye benzer bir patoloji sonrası gelişen servikal apsedir. Koalesan mastoidit sonrası mastoid korteksin tip bölgesinde defekt olursa ve lateral korteks bütünlüğü korunursa enfeksiyon boyuna doğru ilerleyerek sternokleidomastoid kasın derininde apse formasyonuna neden olur. Klinik olarak boyunda genellikle Level 2 bölgesinde derin palpasyonla hassasiyet gösteren kitle tespit edilir. Sıklıkla AOM sonrası ortaya çıkar ancak kolesteatomlu kronik otit sonrası da görülebilmektedir. Tanı için mastoid bölgenin ve boyunun kontrastlı BT tetkiki gereklidir. BT’de genişlemiş derin boyun apsesinin inflamatuvar servikal lenfadenopatilerden ayırıcı tanısı yapılmalıdır. Tedavi, transservikal yaklaşımla apsenin boşaltılması ve kortikal mastoidektomi yapılmasıdır. Beraberinde intravenöz antibiyotik tedavisi verilebilir (88,89).

2. İntratemporal komplikasyonlar:

Labirent fistülü:

Labirent fistülü, kolesteatomlu kronik otitin en sık görülen komplikasyonudur ve vakaların yaklaşık %7’sinde ortaya çıkar. Antruma yakın yerleşimi nedeniyle en sık LSSK’da görülür. Labirent fistüllerinin %90’ı LSSK’da ortaya çıkmakla birlikte süperior ve posterior semisirküler kanalda ve kokleanın kendisinde de ortaya çıkabilir. Kokleada görülen fistüllerde işitme azlığının ortaya çıkma ihtimali daha yüksektir. Kolesteatomlu kronik otitte fistüller osteolizis sonrası ortaya çıkabileceği gibi inflamatuvar mediatörlerin etkisiyle de ortaya çıkabilir. Labirentte ciddi erozyonu olan hastalarda klinik olarak vertigo ve fizik muayenede pozitif fistül testi görülebilir. Preoperatif olarak vertigo hastaların yaklaşık %60’ında görülmektedir. Operasyon sırasında labirent fistülü tespit edilen hastaların ise yaklaşık %32 ile %50’sinde fistül testi pozitif olarak bulunmaktadır. Sensörinöral işitme kaybı en sık görülen klinik bulgu olmasına karşın her zaman fistül varlığına işaret etmez. BT ile ameliyat öncesi fistül varlığının tespit edilmesi vakaların yaklaşık %60’ında mümkün olabilmektedir. Ancak hikaye ve fizik muayene fistül varlığının tespitinde BT’den daha üstündür. Bununla birlikte kesin tanı ancak intraoperatif olarak konabilir. İntraoperatif olarak tespit edilen labirent fistüllerinin tedavisi tartışmalıdır. Küçük fistüllere neden olan kolesteatomların ilk cerrahi sırasında temizlenerek kortikosteroid tedavisi verilmesi önerilirken büyük fistüllerin kolesteatom

temizlendikten sonra kemik çimento veya fasya ile kapatılması önerilmektedir. Bununla birlikte rezidü kolesteatomun labirent üzerinde bırakılarak ikinci cerrahi sırasında çıkarılmasını önerenler de vardır (88,89).

Koalesan mastoidit:

Koalesan mastoidit postauriküler eritem, hassasiyet ve aurikülanın aşağı yada yukarı doğru yer değiştirmesiyle karakterize bir tablodur. Subperiosteal apse ve mastoid efüzyon ile ayırıcı tanısı kontrastlı BT ile yapılır. Koalesan mastoidit, mastoid kemiğin trabekülasyon kaybı ile karakterize akut, enfeksiyöz bir olaydır. Tedavisi intravenöz antibiyotik ile birlikte nekrotik kemik dokuların mastoidektomi işlemiyle temizlenmesini içerir (88,89).

Petröz apisit:

Petröz apeks temporal kemiğin anterior ve medial kısmını oluşturur ve %30 oranında pnömatizedir. Bu pnömatize hücrelerin orta kulak ve mastoid hücrelerle bağlantısı vardır. Dolayısı ile bu bölgelerdeki enfeksiyonlar petröz apekse ulaşarak efüzyon, koelasan enfeksiyon ve apse formasyonuna neden olabilir. Bu bölgenin enfeksiyonları orta ve posterior kranial fossa ile komşuluğundan dolayı tehlike arz ederler. Petröz apisit klinik triadı retroorbital ağrı, 6. kranial sinir paralizi ve kulak akıntısıdır. Bu triad aynı zamanda Gradenigo Sendromu olarak da bilinir. Petröz apisit düşünülen hastalarda BT ile tanı doğrulanmalıdır. Petröz apeks otik kapsül ve karotis arter ile yakın komşuluğu nedeniyle cerrahi olarak ulaşılması zor bir bölgedir. Bu nedenle, intravenöz antibiyotik tedavisi tedavinin ilk basamağını oluşturmaktadır. Medikal tedaviye rağmen enfeksiyonun devam etmesi, nekrotik kemik dokusunun varlığı ve apse formasyonu cerrahi tedavi endikasyonlarını oluşturur (88,89).

Fasiyal paralizi:

Kronik otite bağlı fasiyal paralizi, fallopian kanalındaki konjenital açıklıklardan inflamatuvar mediatörlerin geçmesi ile gerçekleşebileceği gibi kolesteatom ve granülasyon dokusunun kemik kanalı erozyona uğratması nedeniyle de ortaya çıkabilir. Fasiyal paralizi basınç etkisi ile ya da inflamasyon etkisi ile ortaya çıkan ödeme bağlı oluşabileceği gibi, süperatif nöritin nöral elemanları direkt hasarlaması neticesinde de oluşabilir. Ödeme bağlı gelişen fasiyal paralizi erken dönemde tedavi edilmezse ödemin neden olduğu avasküler nekroz aksonal dejenerasyona neden olarak hasarın kalıcı hal almasına yol açabilir. Kolesteatomlu kronik otite bağlı fasiyal paralizin tedavisi cerrahidir. Mastoidektomi

sonrası fasiyal sinir ile temas halindeki kolesteatomun proksimal ve distal segmentleri görülecek şekilde ortaya konur. Sonrasında künt diseksiyon ile kolesteatom sinirden ayrılır (88,89).

Intrakranial komplikasyonlar:

Menenjit:

Menenjit, akut ve kronik otitis medianın en sık görülen intrakranial komplikasyonudur. Menenjit, meninkslere ve subaraknoid mesafeye hematojen yayılım, Hyrits fissürleri ve kemik erozyonu ile direkt yayılım sonucu oluşabilir. Bu üç yoldan en sık hematojen yayılım görülmektedir. İntermitan ya da sürekli ateş, bulantı, kusma, letarji ve baş ağrısı menenjitin başlıca semptomlarıdır. Görsel değişiklikler, ense sertliği, ataksi, mental durumda değişiklik, nöbet geçirme görülebilir. Klinik olarak menenjitten şüphe edildiğinde geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi başlanmalı ve BT ya da MRG ile tanı doğrulanmalıdır. Görüntüleme yöntemleriyle tanı kesinleştirilemezse lumbal ponksiyon ile tanı kesinleştirilmeli, kültür ve antibiyotik duyarlılığı için örnek alınmalıdır. Kolesteatomlu olsun olmasın kronik otite bağlı gelişen tüm menenjitlerde tedaviye gram negatif ve anaerob bakterilere etkili antibiyotikler de eklenmelidir. Antibiyotik tedavisine ek olarak sistemik kortikosteroid tedavisinin nörolojik ve otolojik sekelleri azalttığı gösterilmiştir. Menenjitte mastoidektomi endikasyonları, kolesteatom varlığı, koelasan mastoidit, hastalığın direkt ekstansiyonuna bağlı kemik erozyonunun varlığı ve maksimal medikal tedaviye rağmen semptomların devam etmesidir (88,89).

Beyin apsesi:

Menenjitten sonra en sık görülen ikinci intrakranial komplikasyondur. Menenjit AOM sonrası daha sık görülürken, beyin apsesi KOM sonrası daha sık izlenmektedir. Menenjite göre mortalitesi daha yüksek seyredebilir. En sık temporal lob ve serebellumda apse formasyonu izlenir. Genellikle hematojen yolla tromboflebit sonrası apse oluşumu gelişir. Klinik üç evrede gelişir. İlk evre ensefalitik evredir. Bu evrede ateş, titreme, bulantı, kusma, baş ağrısı, mental durumda değişiklik ve nöbet görülebilir. İkinci evre latent dönemdir. Bu evrede ilk evrede görülen semptomlar azalır. Hastada genel bir yorgunluk ve bitkinlik gözlenir. Son evrede ise ilk evrede görülen semptomlar artmış bir şekilde izlenir. Hastanın hemodinamik parametrelerinde değişiklikler ve intrakranial basınç artışı gözlenir. Menenjiti düşündüren semptomların varlığında çekilen kontrastlı BT ya da MRG tetkiki ile tanı doğrulanır. Beyin apsесinin tanısında MRG, kontrastlı BT'ye göre daha üstündür.

Gram pozitif, gram negatif ve anaerob bakterilere ekili geniş spektrumlu antibiyotiklerle tedaviye tanıdan şüphelenildiği anda başlanmalıdır. Tanı kesinleştirildiğinde cerrahi olarak apse boşaltılmalıdır. Beyin ödemi azaltmak için steroidler ve nöbet geçirme ihtimali nedeniyle de profilaktik olarak antikonvülzanlar tedaviye eklenmelidir. Kolesteatomlu KOM'a bağlı gelişen beyin apsesinde mastoidektominin zamanlaması konusunda farklı görüşler mevcuttur. Mastoidektominin apse drenajından sonra, hasta stabil hale getirildikten sonra yapılması önerilmekle beraber son dönemlerdeki genel kabul gören uygulama, apse drenajı ile eş zamanlı olarak mastoidektomi yapılmasıdır. Cerrahi tedavi sonrası antibiyotik tedavisine uzun süre devam edilmeli ve hasta periyodik BT tetkikleri ile takip edilmelidir (88-90).

Lateral Sinüs Trombozu:

Sigmoid sinüs (lateral sinüs) tromboz ve tromboflebiti, orta kulak ve mastoid hücrelerin enfeksiyonuna sekonder olarak ortaya çıkabilir. Yayılım kolesteatomlu KOM'da olduğu gibi kemik erozyonu sonrası oluşabileceği gibi, enfeksiyonun perisinüzal mesafeye direkt yayılımı ya da mastoid emiser venlerdeki tromboflebitin yayılımı ile de gerçekleşebilir. Sinüs içerisinde intramural trombusların oluşumu ile birlikte, bu trombuslardan kopan parçalar yaşamı tehdit eden komplikasyonlara neden olabilir. Bu kopan parçalara bağlı hidrosefali gelişimi görülebileceği gibi, internal juguler ven aracılığı ile septik pulmoner emboliler de görülebilir. Titremelerle yükselen ateş en önemli klinik bulgudur. Baş ağrısı ve halsizlik diğer semptomları oluşturur. Antibiyotik kullanımı nedeniyle klinik bulgular gizlenebilir. Bu nedenle tanıda temel olan lateral sinüs trombozundan şüphelenilmesidir. Tanıda BT'de sinüs duvarının kontrast tutulumu ile karakterize olan delta belirtisi izlenebilir. Ancak lateral sinüs trombozunun tanısında ve izlenmesinde MRG ve MR venogram daha değerli tetkiklerdir. Lateral sinüs trombozunun tedavisi cerrahidir. Mastoidektomi sonrası sigmoid sinüs ortaya konmalıdır. Bu aşamadan sonra sigmoid sinüsden iğne ile aspirasyon yapılmasını ve aspirayon ile herhangi bir şey gelmemesi ya da püy gelmesi durumunda sinüsün açılarak pıhtının temizlenmesini önerenler olduğu gibi, sadece sinüs çevresindeki inflame dokunun ve granülasyon dokusunun temizlenmesinin yeterli olduğunu belirtenler de vardır. Cerrahi sonrası hasta en az 2 hafta damardan antibiyotik tedavisi almalı ve MRG ve MR venografi ile rekanülasyon ve olası ikincil intrakranial komplikasyonlar açısından takip edilmelidir (88,89).

Epidural Abse:

Epidural apsenin gelişimi genellikle kolesteatom ya da koalesan mastoiditin neden olduğu kemik destrüksiyonununa bağlıdır. KOM kliniğinden farklı olarak başağrısında ve kulak ağrısında artış izlenebilir. Herhangi bir özel klinik bulgusu yoktur. Tanı BT ile kesinleştirilir. Tedavi, mastoidektomi ile birlikte cerrahi drenaj ve antibiyotiktir (88,89).

Otitik Hidrosefali:

Lokal nörolojik semptomlar bulunmaksızın intrakranial basınç artışı ile karakterize patofizyolojisi tam olarak anlaşılamamış bir otit komplikasyonudur. Genellikle lateral sinüs trombozuna bağlı olarak ortaya çıkar. Hastaların semptomları artan intrakranial basınca bağlıdır. Başağrısı, bulantı, kusma, görsel değişiklikler ve letarji izlenebilir. Papil ödem ve intrakranial basınç artışını göstermek için fundoskopik muayene yapılmalıdır. Artmış intrakranial basıncın gösterilmesi, papil ödem varlığı ile birlikte menenjit ve ventriküllerde dilatasyon olmadığının gösterilmesi tanıyı kesinleştirir. MRG ve MR venografi görüntüleme ayırıcı tanı için istenmelidir. Tedavide altta yatan kulak problemi ortadan kaldırılmalı, intrakranial basınç düşürülmelidir (88,89).

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz ve Patoloji Anabilim Dalları tarafından Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Kurulu desteği alınarak yapıldı. Edinilmiş kolesteatomlu kronik otitis media tanısı ile Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi ve Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Kasım 2007 – Haziran 2008 tarihleri arasında ameliyat edilen 40 hasta çalışmaya alındı. Çalışma Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Proje No: KA07/152). Çalışmaya alınan tüm hastalara çalışma hakkında bilgi verildi, çalışmaya katılmak için onayları alındı, gönüllü denek bilgilendirme ve onay formu imzalatıldı.

Hastalara kolesteatomun yaygınlığı ve cerrahın tercihinine göre açık ya da kapalı teknikle timpanomastoidektomi ameliyatı yapıldı. Ameliyat öncesinde tüm hastaların temporal kemik BT görüntülemeleri ve odyolojik incelemeleri elde edildi.

Klinik değişkenler

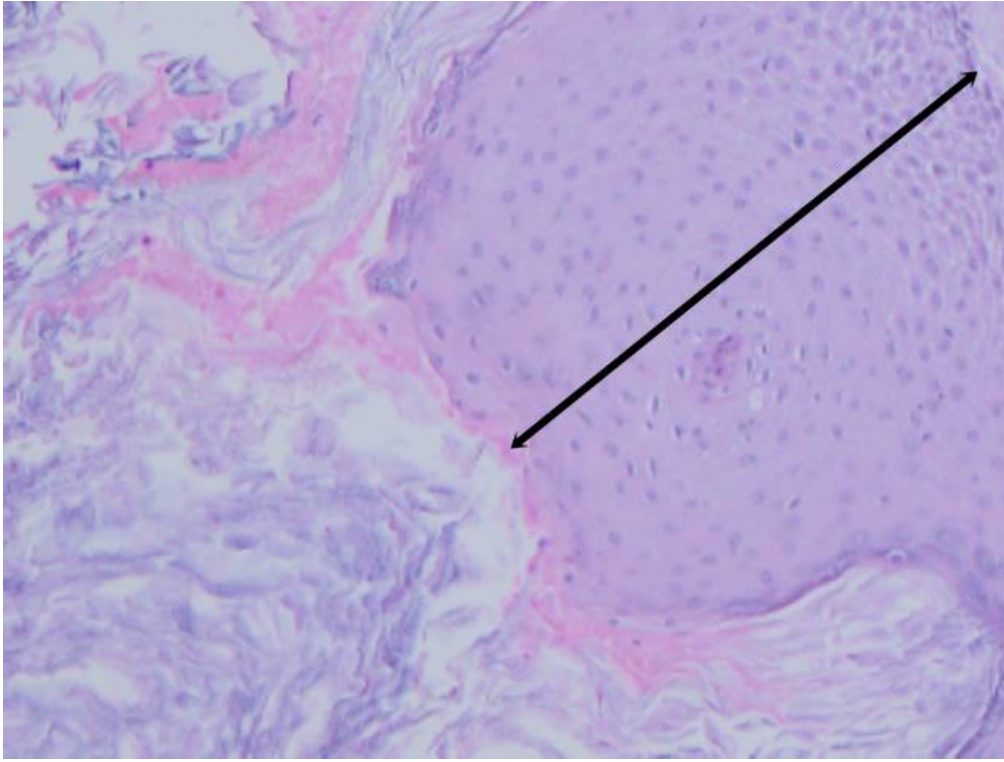
Çalışmaya dahil edilen hastaların yaşları, cinsiyetleri ve operasyon tarihi dikkate alınarak kolesteatoma bağlı semptom süreleri not edildi. Çalışmada değerlendirmeye alınan klinik parametreler şunlardı:

1. *İletim tipi işitme kaybının derecesi:* Her kulak ameliyatı öncesinde yapılan işitme testi sonucunda belirlenen saf ses ortalaması ve hava-kemik aralığı desibel (dB) cinsinden kaydedildi.
2. *Kolesteatomun yaygınlığı:* Kolesteatomun yalnızca orta kulakta olması, mastoid kemiğe doğru yayılması, petröz bölgeye yayılım ve temporal kemik dışına çıkması durumları BT ve ameliyat sırasındaki bulgulara göre hastaya özgü belirlendi.
3. *Kemik yıkımının derecesi:* Orta kulak kemikçiklerinin yıkımı, dış kulak yolu arka duvarının yıkımı ve mastoid hücrelerin yıkımı ile mastoid kemiğin sınırlarına gelmesi, otik kapsül harabiyeti, temporal kemik dışına yayılım özellikleri BT ve ameliyat sırasındaki bulgulara dayanarak saptandı.

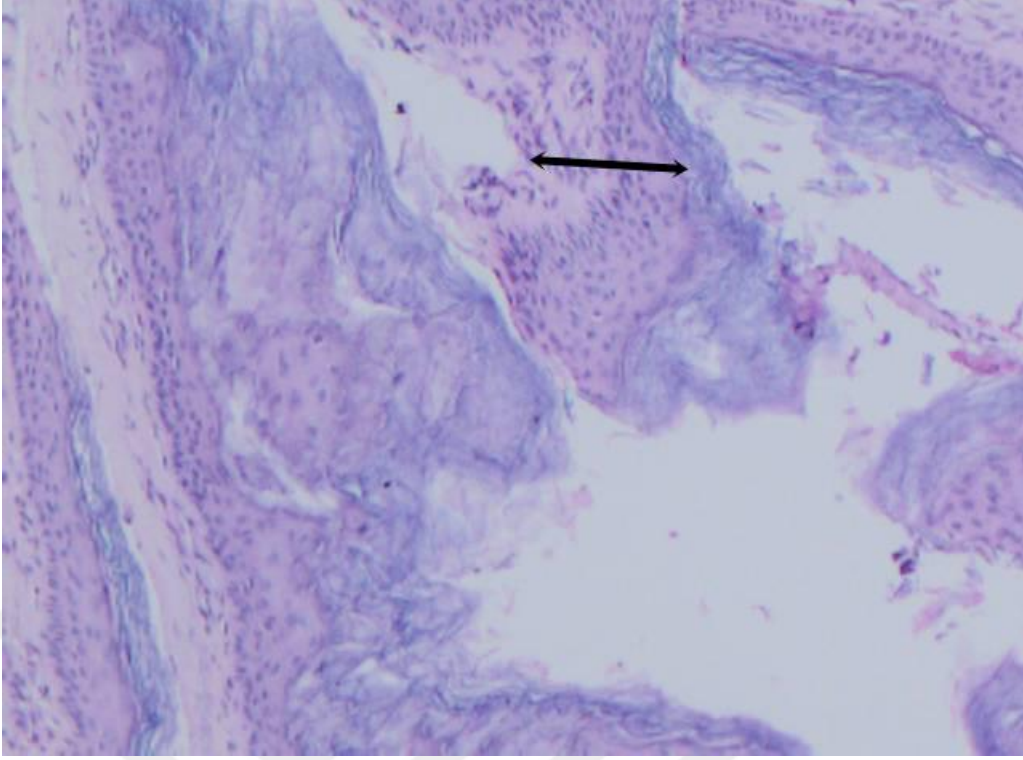
4. *Kolesteatomun saldırganlığı:* Kolesteatoma bağlı fasiyal sinir kanalında yeniklik, tegmen mastoideumda bütünlük kaybı, lateral semisirküler kanalda açıklık ve sigmoid sinüs üzerindeki kemik dokuda yeniklik ve dış kulak yolu arka duvarının yıkımı ayrıca not edildi.

Patolojik değişkenler

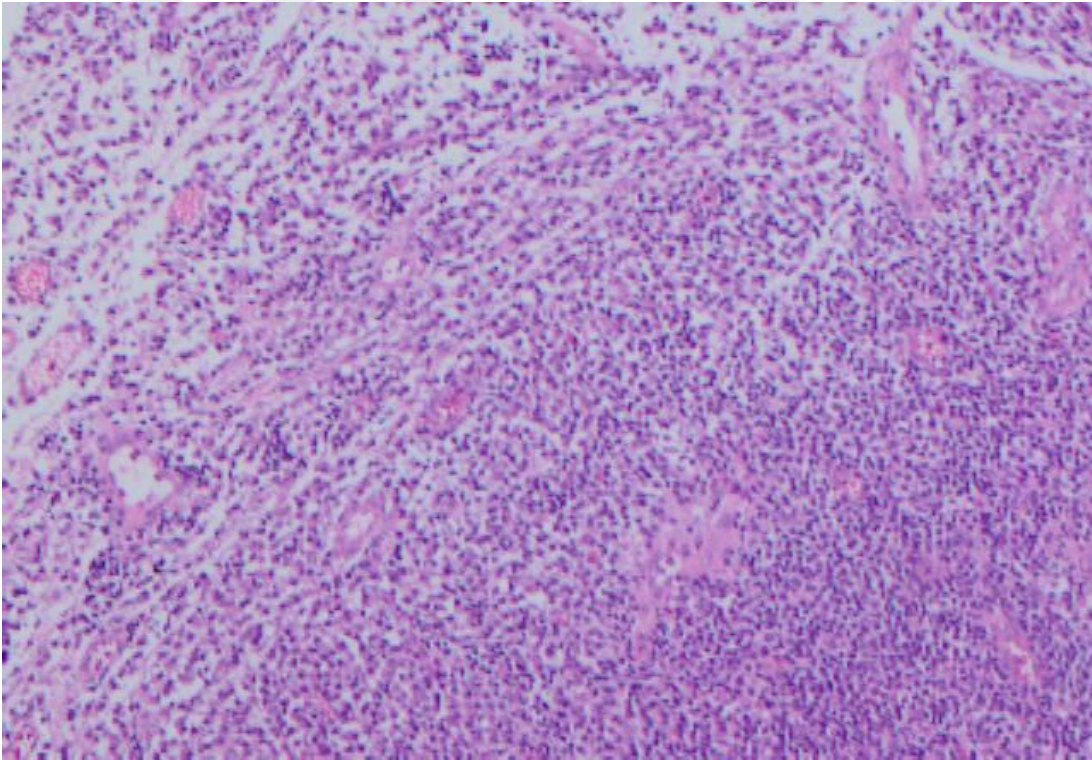
1. *Epitel kalınlığı ve inflamasyon yoğunluğu:* Ameliyat edilen hastalardan rutin cerrahi işlem sırasında alınan kolesteatom ve dış kulak yolu cildi (=kontrol gurubu) parçaları patoloji bölümüne formol tespitinde ayrı ayrı gönderildi. Örneklerin tamamı H&E (hematoksilen-eozin) ile boyanarak ışık mikroskobisinde değerlendirildi. Kolesteatom epitelinin Nikon mikroskop ile 20 büyük büyütme alanında kalınlığı değerlendirildi. 20 büyük büyütme alanında epitel kalınlığı 2.5 mm'den kalın ve ince olanlar şeklinde iki gruba ayrıldı (Şekil-1,2). H&E boyalı kolesteatom örnekleri inflamatuvar hücre yoğunluğuna göre de iki gruba ayrıldı. Epitel altında her alanda inflamatuvar hücrelerin görülmesi yoğun inflamasyon (grup 1) olarak (Şekil-3), tüm alanları içermeyen inflamatuvar hücre dağılımı ise inflamasyonun az olduğu grup (grup 2) olarak değerlendirildi. Kontrol gurubunda epitel kalınlığı ve inflamasyon şiddeti değerlendirilmeye alınmadı.



Şekil 1: Kolesteatom epiteli (epitel kalınlığı 2.5mm'den kalın) X200 H&E.

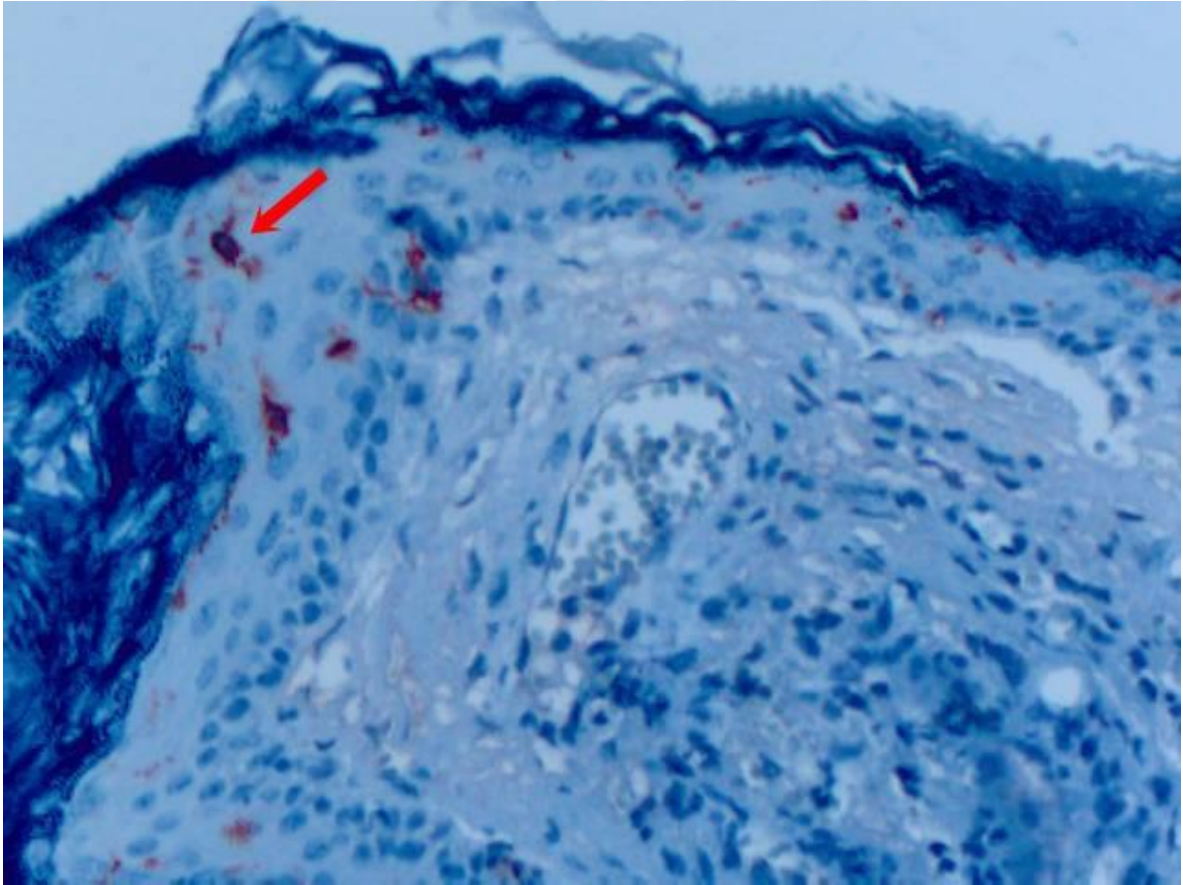


Şekil 2: Kolesteatom epiteli (epitel kalınlığı 2.5 mm'den ince) X200 H&E.

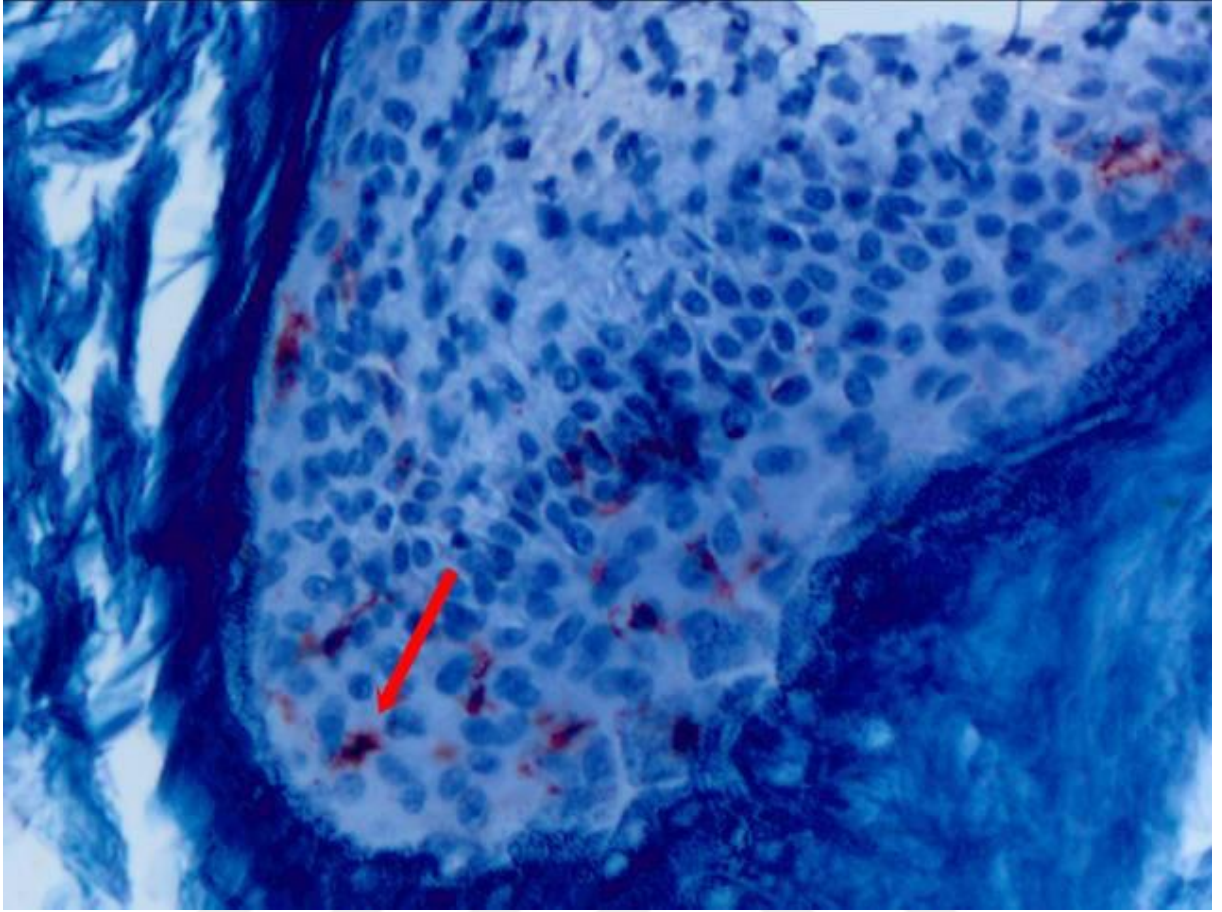


Şekil 3: Kolesteatom epiteli altında yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu.

2.Langerhans hücre dağılımı: Olguların tamamından alınan örnekler % 10'luk formalin solüsyonunda fiks edilip, rutin takip işleminden sonra parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan hazırlanan 5 mikron incelikteki kesitler pol-L-lysin ile kaplanmış lamlara alındıktan sonra 37° C'deki etüvde 12 saat bekletilerek deparafinize edildi. Hidrojen peroksitte (H₂O₂) 15 dakika bekletildikten sonra kesitler Tris-buffered saline (TBS) (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH: 7,6) ile yıkandı. "Protein blocking solution" (PBS) damlatılarak oda ısısında 10 dakika bekletildi. Bu kesitler Langerhans hücre varlığını belirlemek için CD1a antikoru ile (NeoMarkers, MS.1856, R7, Lab Vision Corp., ABD) oda ısısında 2,5 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben TBS ile yıkanan dokular biotin ile 15 dakika ve streptavidin HRP ile 15 dakika inkübe edildi. Tekrar TBS ile yıkanan dokulara 15 dakika AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) uygulandı, bu işlemi takiben hematoksisilen ile zemin boyası yapılarak su ile yıkanıp lamel ile kapatıldı (Şekil-4,5). CD1a'nın pozitif kontrolü için cilt dokusu alındı ve epitel içi dentritik hücre boyanması değerlendirildi.

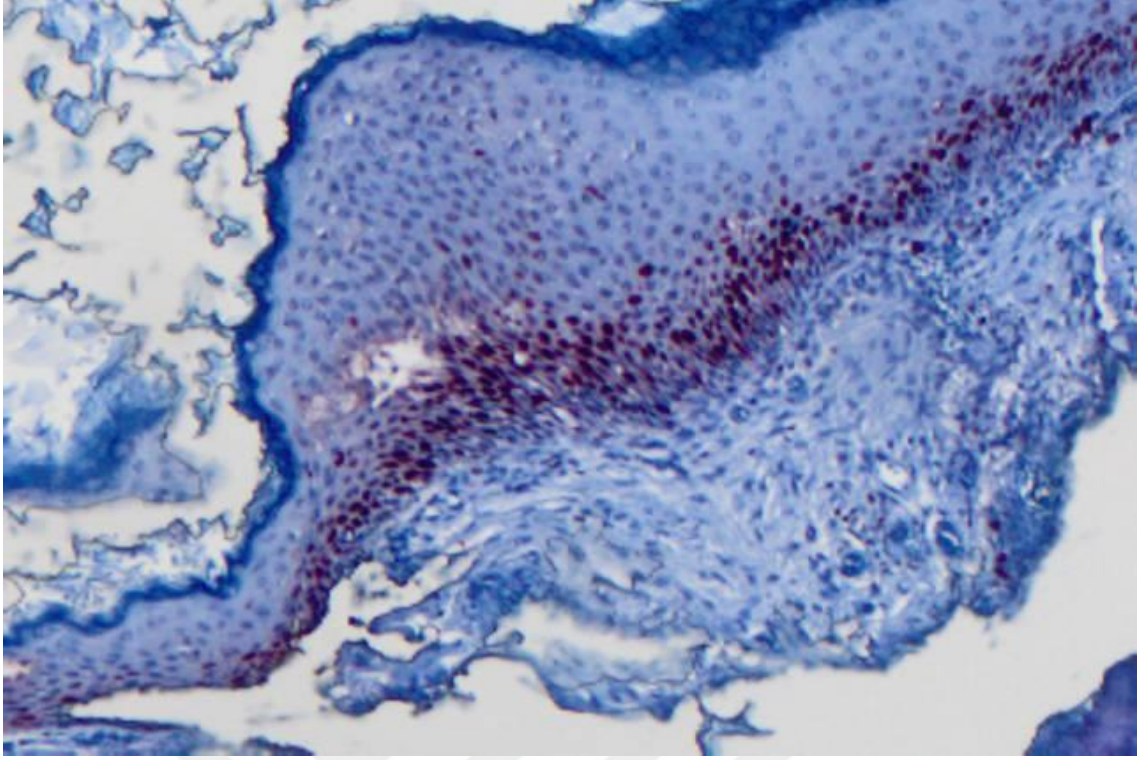


Şekil 4: Kolestomat epitelinde CD1a boyanması X200.

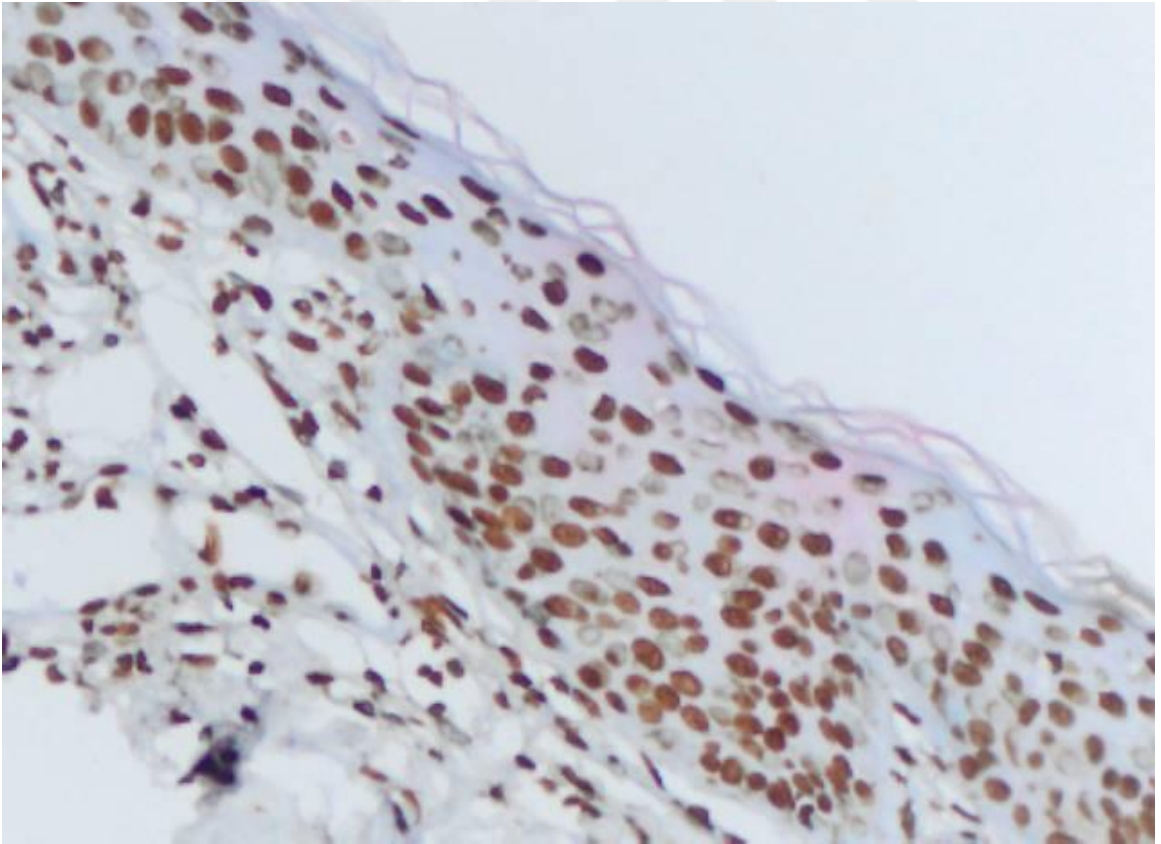


Şekil 5: Kolestomat epitelinde CD1a boyanması X400.

3. *Ki-67:* Örnekler % 10'luk formalin solüsyonunda fikse edilip, rutin takip işleminden sonra parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan hazırlanan 5 mikron incelikteki kesitler pol-L-lysin ile kaplanmış lamlara alındıktan sonra 37° C'deki etüvde 12 saat bekletilerek deparafinize edildi. Hidrojen peroksitte (H₂O₂) 15 dakika bekletildikten sonra kesitler Tris-buffered saline (TBS) (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH: 7,6) ile yıkandı. PBS damlatılarak oda ısısında 10 dakika bekletildi ve Ki-67 antikoru (SP6) (RM-9106-R7, NeoMarkers, Lab Vision Corp., ABD) ile oda ısısında 2,5 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben TBS ile yıkanan dokular biotin ile 15 dakika ve streptavidin HRP ile 15 dakika inkübe edildi. Tekrar TBS ile yıkanan dokulara 15 dakika AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) uygulandı ve bu işlemi takiben hematoksilin ile zemin boyası yapılarak su ile yıkanıp lamel ile kapatıldı (Şekil-6,7). Ki-67'nin pozitif kontrolü için tonsil dokusundan alınmış lenfoid folliküllerin germinal merkez boyanması değerlendirildi.



Şekil 6: Kolesteatom epitelinde nükleer Ki-67 boyanması X200.

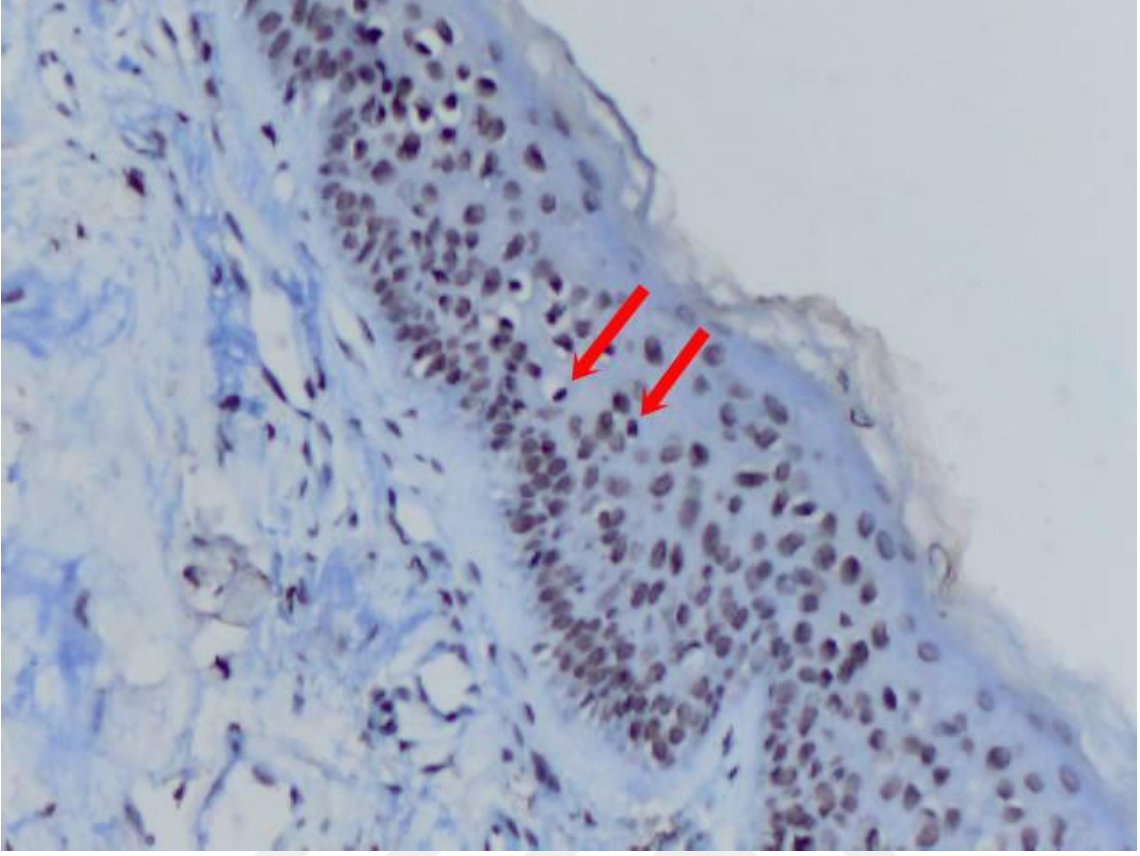


Şekil 7: Kolesteatom epitelinde nükleer Ki-67 boyanması X400.

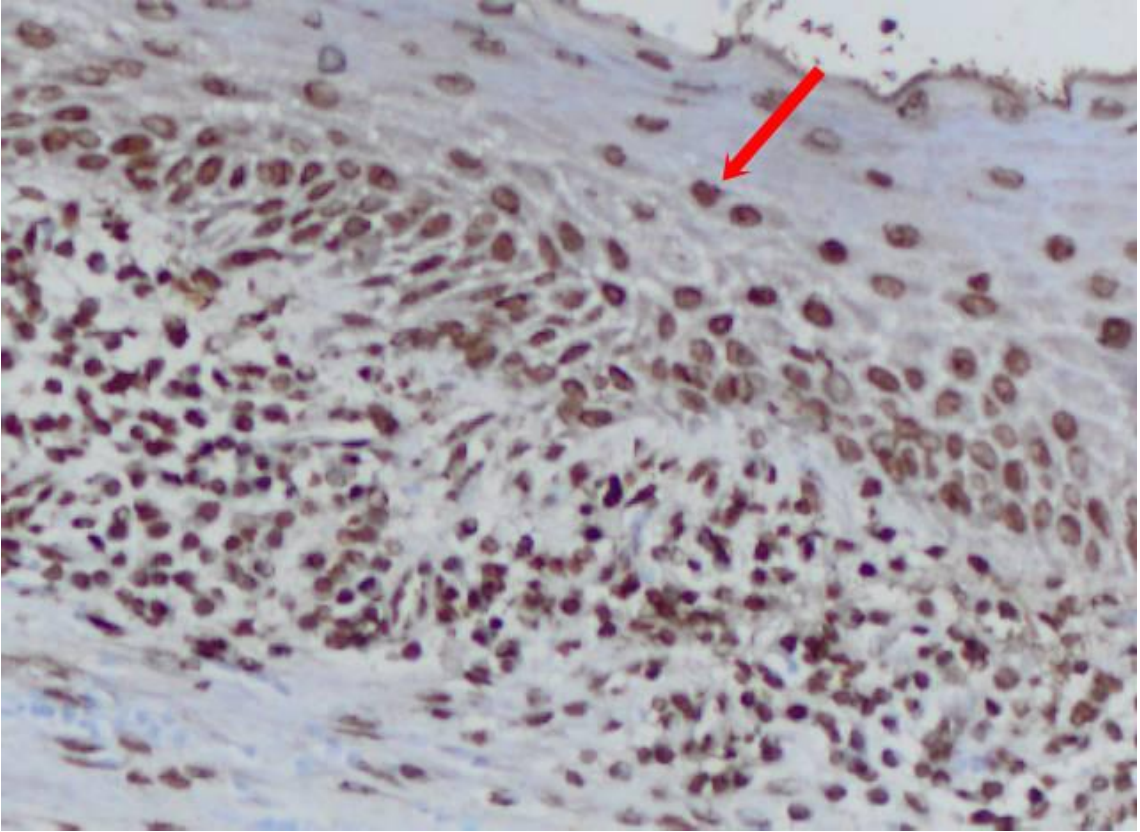
Langerhans hücresi infiltrasyonunu değerlendirmede ışık mikroskopunda uygun büyütme altında (x40) en çok boyanan 3 alandaki 100 hücrede CD1a ile boyanan Langerhans hücre sayısı belirlendi. Langerhans hücrelerinde olduğu gibi Ki-67 için x40 büyütme altında en çok boyanan 3 alan değerlendirilerek 100 epitel hücresinden boyanan epitel hücre sayılarının ortalaması alındı. Ki-67 ile nükleer koyu boyanma pozitif kabul edilirken, CD1a için sitoplazmik membran boyanması doğru ve değerlendirilen boyanma şekli olarak kabul edildi.

4. APO 2.7: Apoptozis, APO2.7 antijenine karşı kullanılan antikörlerle tespit edildi. APO2.7 proteini mitokondrial membranda yerleşen ve apoptozisin erken fazlarında ortaya çıkan bir proteindir. Olgularda apoptozisin tespitinde parafin bloklara immünohistokimyasal yöntemle TUNEL (terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP nick-end labeling) yöntemi ile ApopTag (ApopTag in situ değerlendirme kiti: S7101; Intergen, Purchase, NY, ABD) antikoru uygulandı. Işık mikroskopunda en yoğun boyanan 3 farklı 40 büyük büyütme alanında 100 hücrede boyanan hücre sayısının ortalaması alındı (Şekil-8,9). Boyanma paterni epitel hücre çekirdeğini tamamen kaplayan ve koyu kahve renkte boyanan hücreler değerlendirildi, soluk ve açık renk boyanma değerlendirme dışı bırakıldı.

TUNEL yöntemi şu şekilde uygulandı: Parafin bloklardan hazırlanan 5 mikron incelikteki kesitler deparafinize edilerek, azalan konsantrasyondaki alkol ile muamele edilip rehidrate edildi. Deparafinize dokular, örneklerin geçirgenliğini arttırmak için, taze hazırlanan proteinase K (20 mikrogram/mL) solüsyonu ile oda sıcaklığında 15 dakika muamele edildi. Kesitler iki kez distile su ile yıkandıktan sonra, endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla, PBS solüsyonu içinde, 3% H₂O₂ ile 5 dakika inkübe edildi, ardından PBS ile 5 dakika süre ile yıkandı. Sonrasında hızlı bir şekilde 75 mikrolitre equilibration buffer uygulandı ve 30 dakika beklendi. Örnekler daha sonra TUNEL reaksiyon karışımına tabii tutuldu (Bu karışım 9-OH DNA bitiminin serbest nükleotidlerinin polimerizasyonunu şablon bağımsız olarak katalize etmektedir) ve DNA'nın kırılmış parçalarını işaretlemek için RT'de nemlendirme odasında 1 saat tutuldu. Daha sonra Converter-POD ile 30 dakika inkübe edildi, boyama için 12 dakika 3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC) ile muamele edildi. Sonrasında metil yeşili ile ters boyama uygulandı. Uygulanan işlemler arasında preperatlar PBS ile yıkandı.



Şekil 8: Kolesteatom epitelinde ApopTag boyanması X200.



Şekil 9: ApopTag ile boyanan epitel hücre çekirdekleri X400.

Klinisyen hastanın klinik durumunu not etti. Patolojide Langerhans hücrelerinin kolesteatomdaki dağılımı hesaplandı, Ki-67 ve APO 2.7 boyamaları yapıldı, sonuçlar ayrı ayrı not edildi. Patoloji doktorunun hastaların klinik durumlarından haberi olmadı ve bu şekilde çalışma kör özellik kazandı.

Toplanan sonuçlar istatistik değerlendirmeye alındı. Verilerin istatistik değerlendirmesinde Levene testi, Student T-test, Mann-Whitney U ve tek yönlü ANOVA testleri kullanıldı, $p<0.05$ anlamlı kabul edildi.



BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 40 hastanın 17'si (%42.5) kadın 23'ü (%57.5) erkekti. Hastaların yaş dağılımı 7 ile 62 arasında değişirken ortalama yaş 35 ± 16 yıl idi.

Hastaların operasyon tarihi dikkate alınarak kolesteatoma bağlı semptom süreleri incelendiğinde, ortalama semptom süresi 12.7 ± 10.7 yıl (aralık, 1-44 yıl) olarak tespit edildi. Ortalama saf ses ortalaması 54 ± 19 dB (aralık, 8-90 dB) ve ortalama hava kemik aralığı 31 ± 12 dB (aralık, 10-54 dB) idi. BT'de 34 (%85) olguda mastoid kemikle sınırlı hastalık varken, 6 (%15) olguda temporal kemik dışına çıkmış hastalık vardı.

Hastaların 11'inde (% 27.5) sağ, 29'unda (%72.5) sol kulak ameliyat edildi. Cerrahi olarak 8 olguda (%20) kapalı teknik, 32 (%80) olguda açık teknik kullanıldı. Ameliyat sırasında 2 olguda (%5) kemikçik sistemin salim olduğu, 1 olguda (%2.5) sadece malleusun, 8 olguda (%20) sadece inkusun, 14 olguda (%35) malleus ve inkusun, 2 olguda (%5) inkus ve stapesin, 13 olguda (%32.5) ise tüm kemikçiklerin yıkıldığı tespit edildi.

Yıkılan kemikçikler yeniden sınıflandırıldığında kemikçik yıkımı olmayan ve sadece 1 kemikçik yıkımı olanlar bir guruba (n=11, %27.5), 1'den fazla kemikçikte yıkımı olanlar ikinci guruba (n=29, %72.5) alındı. CD1a skorları (p=0.419), Ki-67 indeksi (p=0.178) ve apoptozis skorları (p=0.611) açısından iki grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık tespit edilmedi.

Sekiz olguda (%20) fasiyal kanalın, 7 olguda (%17.5) lateral semisirküler kanalın açıkta olduğu; 12 olguda (%30) tegmen mastoideumda eksiklik olduğu; 22 olguda (%55) skutumun yenik olduğu görüldü (Tablo-1). LSSK, fasiyal kanal, tegmen ve skutum açıklıklarından herhangi birisine sahip hastaların toplandığı kemik yıkımının genel komplikasyon gurubu (n=25) ile bunların görülmediği hasta gurubu (n=15) patolojik bulgular açısından karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü (p>0.05) (Tablo-3).

Tablo 1: Operasyon bulguları.

	Var	Yok
Fasiyal kanal açıklığı	8 (%20)	32 (%80)
LSSK açıklığı	7 (%17.5)	33 (%82.5)
Tegmen mastoideumda eksiklik	12 (%30)	28 (%70)
Skutumda yeniklik	22 (%55)	18 (%45)
Genel komplikasyon (kemik yıkımı)	25 (%37.5)	15 (%62.5)

LSSK: Lateral semisirküler kanal

Patolojik incelemede, Langerhans hücrelerinin kolesteatom epitelinde (ortalama 27 ± 9 hücre/saha) dış kulak yolu cildine göre (ortalama 9 ± 6 hücre/saha) daha yoğun toplandığı ($p<0.001$); Ki-67 indeksinin kolesteatom epitelinde daha yüksek olduğu (ortalama 38 ± 14 'e karşı 14 ± 9) ($p<0.001$); apoptozisin kolesteatom epitelinde (ortalama 44 ± 13 'e karşı 17 ± 11) daha belirgin olduğu ($p<0.001$) saptandı (Tablo-2). Patolojik parametrelerden inflamasyon yoğunluğu ve epitel kalınlığı ile Langerhans hücre skorları, Ki-67 ve apoptozis skorları karşılaştırıldığında; inflamasyonun yoğun olduğu grupta Ki-67 skorlarının da istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ($p=0.001$).

Tablo 2: Kolesteatom epiteli ve DKY cildinde Langerhans, Ki-67 ve apoptotik hücre oranları.

	DKY cildi (ortalama hücre/saha)	Kolesteatom epiteli (ortalama hücre/saha)	p değeri
Langerhans hücre dağılımı	9 ± 6	27 ± 9	$p<0.001$
Ki-67 indeksi	14 ± 9	38 ± 14	$p<0.001$
Apoptotik hücre oranları	17 ± 11	44 ± 13	$p<0.001$

Klinik ve patolojik bulgular arasındaki tek anlamlı ilişki ise, açık teknik yapılan olgularda Ki-67 indeksi ($p=0.041$) ve apoptozis yoğunluğunun ($p=0.032$) kapalı teknik kullanılanlara göre daha yüksek olması idi.

Tüm klinik özelliklerin patolojik bulgularla karşılaştırılması Tablo-3 de verildi.

Tablo 3. Klinik ve patolojik özelliklerin karşılaştırılması sonucunda elde edilen p değerleri.

	CD1a	Ki-67	ApoTag
BT’de yaygınlık	0.925	0.513	0.643
Kemikçik yıkımı	0.362 [§]	0.297 [§]	0.086 [§]
İnflamasyon	0.933	0.001	0.416*
Epitel kalınlığı	0.297	0.499*	0.870
Operasyon tarafı	0.266	0.529	0.455
Operasyon türü	0.738	0.041	0.032
Fasiyal kanal açıklığı	0.587	0.922	0.291
LSSK yenikliği	0.947	0.064	0.759
Tegmen açıklığı	0.442	0.756*	0.394
Skutum yenikliği	0.638	0.439	0.535
Genel komplikasyon (kemik yıkımı)	0.931	0.860	0.581

*Levene testinde homojenite elde edilemediği için ($p<0.05$) Mann-Whitney U testi kullanıldı.

[§] Tek yönlü ANOVA testi kullanıldı.

Diğer tüm p değerleri Student T-test ile elde edildi.

LSSK: Lateral semisirküler kanal

TARTIŞMA

Kolesteatom patogenezi ile ilgili olarak ileri sürülen hipotezlerde yara iyileşmesi sürecindeki bozuklukların önemli yeri olduğu düşünülmektedir. Buna göre kolesteatoma eşlik eden bakteriyel biofilm tabakasının neden olduğu kronik ve tekrarlayıcı enfeksiyonlar kronik inflamatuvar süreci tetiklemektedir. Kolesteatomda inflamasyona bağlı olarak ortaya çıkan uyaranlar ise yara iyileşmesi sırasında gerçekleşen olaylar zincirini tetikler. Kolesteatom dokusundaki aşırı çoğalma gibi bozulmuş epitelyal fonksiyonlardan ise inflamasyon dokusundaki immün sistem hücrelerinden salgılanan sitokinler ve büyüme faktörleri sorumlu tutulmaktadır (2,3).

Sudhoff ve ark. kolesteatom stromasında artmış makrofaj ve lenfosit sayıları ile birlikte interlökin-1 (IL-1) ve TGF-alfa düzeylerinde artış tespit etmişlerdir (58). Ottaviani ve ark. ise kolesteatomun perimatriks tabakasında T-helper hücreler, plazma hücreleri, dağınık olarak bulunan T-supressör hücreler ve B-hücreleri ile birlikte özellikle epitele yakın bölgelerde mast hücreleri tespit etmişlerdir. Bu çalışmada T-helper1 lenfosit subpopülasyonunun kolesteatomdaki inflamatuvar reaksiyonlarda daha baskın rol oynadığı gösterilmiştir (63).

Kolesteatom patogenezinde immün sistemin önemli bir rol üstlendiğinin belirtilmesi ve perimatriks tabakasındaki immün sistem hücreleri ile ilgili çeşitli bulgular olmasına karşın; kolesteatom epitelinin bu süreçte oynadığı rol epidermiste yerleşim gösteren Langerhans hücreleri ile ilgili araştırmalarla gündeme gelmiştir.

Langerhans hücreleri epidermiste yerleşen dentritik hücrelerdir. Dentrit Yunanca dendron kelimesinden türemiştir. Dendron ağaç anlamına gelmektedir ve bu hücrelerin uzun sitoplazmik uzantılarından dolayı bu isimlendirme yapılmıştır. Dentritik hücreler oldukça heterojen bir hücre gurubunu içermektedir. Bu hücreler birçok organın bağ dokusunda bulunmaktadır. Mononükleer hücrelerin %0.1-1'ni oluşturan dentritik hücreler genellikle deri, burun mukozası, solunum sistemi ve sindirim sistemi gibi vücudun dışarı açılan bölgelerinde bulunurlar. Birincil T hücre bağımlı bağışık yanıtın oluşmasında en önemli hücrelerdir. Dentritik hücreler lokalizasyonlarına göre farklı isimler almaktadırlar. Langerhans hücresi epidermiste yerleşen dentritik hücreleri tanımlamak için kullanılan bir terminolojidir (7).

Langerhans hücrelerinin fagositik aktiviteleri yoktur veya çok düşüktür. İmmünolojik olarak önemleri Ig reseptörlerine (Fc-IgG), C3 reseptörlerine ve major histokompatibilite kompleksi (MHC: Major histocompatibility complex) antijenlerine sahip olduklarının gösterilmesi ile birlikte ortaya konmuştur ve hem MHC Class I hem de MHC Class II antijenleri eksprese ederler. Langerhans hücreleri kemik iliğinden kaynaklanan hücrelerdir. Tüm dentritik hücreler gibi Langerhans hücreleri de normalde immatürdür. Virüs, bakteri, fungus ile temas ettiklerinde matür dentritik hücreler haline dönüşürler. Epidermiste bulunmalarına karşın hareketlilik gösterirler ve antijenle karşılaştıktan sonra, bu antijenleri sunmak için T lenfositlerin bulunduğu bölgelere göç edebilirler (7).

Langerhans hücreleri kolesteatom epitelinde varlığı bilinen hücrelerdir. Gantz yaptığı çalışmada normal kulak zarında, DKY cildinde ve kolesteatom matriksinde Langerhans hücrelerinin varlığını göstermiş, normal kulak zarının mukozal yüzeyinde ise Langerhans hücrelerinin olmadığını tespit etmiştir. Bu çalışmada Langerhans hücrelerinde Birbeck granülleri olarak bilinen tenis raketi şeklindeki sitoplazmik yapılar da tespit edilmiştir. Bu yapılar aynı zamanda Langerhans hücreleri için patognomoniktir. Bu çalışmada elektron mikroskopik yöntemler ve immünhistokimyasal teknikler kullanılmıştır. Elde edilen DKY ve timpanik membran örnekleri, nörotolojik girişimler uygulanan ve ameliyat öncesi normal orta kulak fizyolojine sahip hastalardan sağlanmıştır. Elektron mikroskopik değerlendirmenin yanı sıra, immünhistokimyasal yöntem olarak OKT-6 monoklonal antikoru kullanılmıştır. OKT-6 ile işaretlenen hücreler, uygun immünhistokimyasal işlemlerden geçirildikten sonra indirekt immünfloresan yöntemle değerlendirilmiştir. İncelenen örneklerden kolesteatom matriksinde hem DKY'ye hem de kulak zarına göre daha fazla Langerhans hücresi tespit edilmiştir. Bu hücrelerin tüm epitelyal katmanlarda olduğu görülmüştür. Bu durum normal epitelde gözlenen Langerhans hücre dağılımından farklılık göstermektedir. Ayrıca kolesteatom epitelinde tespit edilen bu hücrelerin sitoplazmalarında daha yoğun olarak sekretuar hücre komponenti tespit edilmiştir. Bununla birlikte Birbeck granüllerinin özelliklerinde değişiklik tespit edilmemiştir. Bu çalışmada, normal kulak zarı epitelinde elde edilen düşük miktardaki Langerhans hücre sayılarının, kulak zarının migratuar özelliğinden kaynaklanabileceği yorumu yapılmıştır. Kolesteatom epitelinde gözlenen, normal dokuya göre daha yoğun olan Langerhans hücre popülasyonu ise kronik inflamatuvar sürecin bir sonucu olarak yorumlanmaktadır. Ayrıca bu hücrelerdeki artmış sitoplazmik granüller, artmış sekretuar

özelliklere de işaret etmektedir ve bu durum deride görülen kontakt aşırı duyarlılık reaksiyonlarına benzetilmektedir (4).

Veldman ve ark. Langerhans hücrelerine karşı monoklonal antikorları kullanarak yapmış oldukları çalışmanın kolesteatom örneklerinde bu hücrelerin varlığını göstermişlerdir (91). Otopsilerden elde ettikleri kulak zarı örneklerinde ise Langerhans hücrelerinin olmadığını bildirmektedirler. Van Dijk ve ark. da otopsi örneklerinde gerçekleştirdikleri incelemelerde normal kulak zarı örneklerinde Veldman ve ark.'nın elde ettiği bulgulara paralel bulgular elde ederken, enfekte kulak zarında Langerhans hücrelerinin yoğun bir şekilde var olduğunu bildirmektedirler (92). Hussl ve ark. ise postmortem olarak inceledikleri kulak zarı örneklerinde dentritik hücrelerin varlığını göstermişler ancak bu hücrelerin farklı immünohistokimyasal özellikler gösterdiğini belirtmişlerdir (93). Rowden ve ark. sitoplazmik bir protein olan S-100 proteinine yönelik belirteçlerle kolesteatom dokusunda Langerhans hücrelerinin gösterilebileceğini ortaya koymuşlardır (94). S-100 proteinine yönelik belirteçler kullanılarak yapılan başka bir çalışmada; Takahashi ve Nakano otore görülen kolesteatomlu kronik otit örneklerinde, otore görülmeyenlere göre daha yüksek Langerhans hücre tutulumu bildirmişler ve kolesteatomdaki kronik inflamatuvar süreçten Langerhans hücrelerinin sorumlu olduğunu savunmuşlardır (94,95).

Mayot ve ark. çocuk yaş gurubunda, farklı hastalardan elde ettikleri kolesteatom matriksi, perimatriks ve retraksiyon cebi örneklerini immünolojik özellikleri açısından karşılaştırmışlardır. Langerhans hücrelerinin tüm epidermis örneklerinde mevcut olduğunu ancak her zaman MHC Class II antijenine sahip olmadığını tespit etmişlerdir. Bununla birlikte lamina propriada yerleşen Langerhans hücrelerinin polimorfonükleer infiltrasyonla yakın ilişki halinde olduğunu ve MHC Class II antijenine sahip olduklarını göstermişlerdir. MHC Class II antijenlerinin salınımına neden olanın ise Langerhans hücrelerinin aktivasyonuna neden olan polimorfonükleer hücrelerden salınan mediatörler olabileceği yorumunu yapmışlardır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara dayanarak çocukluk yaş gurubundaki kolesteatom örnekleri ile erişkinlerdeki kolesteatom örneklerinin benzer çoğalma özelliklerine sahip olduğunu savunmuşlardır (96).

Kamide ve ark. Langerhans hücrelerinin keratinositler üzerine olan etkinliklerini invitro olarak incelemişler ve Langerhans hücrelerinin keratinositlerin çoğalma ve farklılaşmasına neden olduğunu ortaya koymuşlardır (97).

Aberg ve ark. kolesteatom epiteli ile DKY cildinin Langerhans hücre dağılımlarında bir farklılık olmadığını ileri sürmüşlerdir (98). Park ise kolesteatom örneklerinin, mastoid kavite cildinin ve postauriküler cildin Langerhans hücre skorlarını karşılaştırmış; gerek kavite cildinde gerekse kolesteatom örneklerinde, postauriküler cilde göre daha yüksek Langerhans hücre skorları bildirmiş ve inflamasyonun yoğun olduğu örneklerde daha yüksek Langerhans hücre skorları saptamıştır. Park sonuç olarak Langerhans hücrelerinin immün savunma mekanizmalarında aktif rol oynadığı ancak kolesteatom gelişimi ile ilgili çok özel bir fonksiyonu olmadığı yorumunu yapmıştır. Park'ın bu görüşü daha önce Palva ve Taskinen'in Langerhans hücrelerinin kolesteatom gelişiminde çok özel bir rolü olmadığı görüşünü destekler niteliktedir (99,100).

İnflamasyon doku hasarına karşı gelişen normal bir immün cevaptır ve hasarlanan dokunun tamir edilmesi ve fonksiyonlarını tekrar kazanması için gereklidir. Kolesteatom epitelinin artmış proliferasyon göstermesinde kolesteatoma eşlik eden inflamasyon dokusunda tespit edilen immün sistem hücrelerinden salgılanan sitokinler ve büyüme faktörleri sorumlu tutulmaktadır (63). Literatürdeki çalışmalar ise Langerhans hücrelerinin kolesteatomda hücre aracılı immün yanıtın başlatılmasında; keratinositlerin çoğalma ve farklılaşmasında aktif rol oynadığını göstermektedir (97,101). Dolayısı ile artmış olan Langerhans hücre skorlarının artmış epitelyal proliferasyonla ve daha destrüktif özellikler gösteren kolesteatom örnekleri ile kolerasyon göstermesi beklenebilir. Ancak yapmış olduğumuz çalışmada; inflamasyonun yoğun olduğu kolesteatom örnekleri ile inflamasyonun yoğun olmadığı kolesteatom örnekleri arasında Langerhans hücre skorları arasında bir farklılık tespit edilmedi. Klinik olarak daha saldırgan özellikler gösteren kolesteatom örneklerinde de artmış Langerhans hücre skorları bulunmadı. Bununla birlikte kolesteatom epitelinden elde edilen örneklerde, kontrol gurubuna (normal DKY cildi) göre artmış Langerhans hücre skorları tespit edildi. Elde ettiğimiz bulgular ışığında Langerhans hücre skorlarının kolesteatomda artış gösterdiği, ancak bu durumun hastalığın klinik seyri için belirleyici olamayacağı sonucuna varıldı.

Kolesteatomun hiperproliferatif potansiyelini göstermek amacıyla pek çok işaretleyici denenmiştir. Bunlardan birisi PCNA'dır. PCNA, DNA replikasyonu, DNA tamiri ve apoptozis ile ilişkilidir. Bu nedenle PCNA'nın proliferasyonun belirleyicisi olacağı düşünülmüştür (102). Ancak yapılan çalışmalarda PCNA'nın yanlış (+) ve yanlış (-) sonuçlara neden olacak şekilde, uygulanan işlemlere duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca PCNA'nın proliferasyon olmaksızın inflamatuvar durumlarda da artış gösterdiği

tespit edilmiştir. Kolesteatom sıklıkla kronik inflamasyon ile ilişkili olduğu için, bu durum PCNA'nın kolesteatomda proliferasyonun belirlenmesi için uygun bir belirteç olmamasına yol açmaktadır (12,103,104).

PCNA gibi kolesteatomda proliferasyonun belirlenmesi için pek çok madde ile yapılan immunhistokimyasal metodlar, kullanılan yöntemin insanlara uygulanamaması, fiksasyon ve boyamalar sırasında yeterli standardizasyonun sağlanamaması gibi çeşitli nedenlerle etkisiz kalmıştır (12).

Ki-67 proteini ilk kez 1983 yılında Gerdes ve ark. tarafından Hodgkin lenfoma ile immunize edilmiş kobay hücrelerinde gösterilmiştir (105). Daha sonra yapısı tanımlanan bu proteinin fizyolojik rolü henüz net olarak ortaya konulamamıştır. Ki-67 proteini muhtemelen kromozomların kondensasyon ve decondensasyonunda, kromozomların korunmasında ve stabilizasyonunda, nükleoler proteinlerin bölünme sırasında eşit dağılımında rol oynamaktadır. Çoğalan tüm hücrelerde gösterilen bu protein, hücrelerin çoğalmasını göstermekte önemli bir belirteç haline gelmiştir. İnsan Ki-67 proteinine karşı antikörlerin enjeksiyonu sonrası hücre bölünmesinde azalma görülmektedir. Bu nedenle Ki-67'nin hücre proliferasyonunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir (106,107).

Ki-67 proteininin monoklonal MIB-1 antikoru ile işaretlenmesi frozen incelemelerde zayıf morfoloji nedeniyle yanlış pozitif sonuç elde edilmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle bu inceleme frozen kesitler için uygun değildir. Yine bazı çalışmalarda kolesteatomda, istenmeyen sitoplazmik boyanma tanımlanmıştır. Bu yanlış (+) sonuçlar zayıf metodolojiye, uygun olmayan fiksasyona ve uzamış bekletme sürelerine bağlı olabilmektedir (108-110).

Raynov ve ark., kolesteatomda Ki-67 salınımının immunhistokimyasal kantitatif özelliklerini ortaya koymak için kolesteatom dokusundaki Ki-67 salınımını, retroauriküler deri ve DKY cildi ile karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada aynı zamanda hücre siklusuna bağlı Ki-67 lokalizasyonunu belirlemek amacıyla kolesteatomdan elde edilen keratinositler kullanılmıştır. Rutin cerrahi girişim sırasında 5 kolesteatomlu otit olgusundan DKY cildi ve retroauriküler cilt örnekleri alınmıştır. Pozitif kontrol grubu olarak 3 hastanın palatin tonsillerinden alınan yüzeyel skuamöz epitel kullanılmıştır. Bu çalışmada kolesteatom epiteli ve kontrol grubu olarak kullanılan retroauriküler cilt ve DKY cildi, Ki-67 ekspresyonunu belirlemek amacıyla MIB-1 monoklonal antikoru ile immunhistokimyasal olarak boyanmıştır. Kolesteatom dokusundan izole edilen keratinositler de uygun

işlemlerden geçirilerek monoklonal MIB-1 antikoru ile muamele edilmiştir. Bu çalışmada MIB-1 (+) nükleer boyanma paterni orta kulak kolesteatom örneklerinde özellikle suprabazal ve bazal tabakalarda gösterilmiştir. Aynı kolesteatom sipesmenlerinde, kolesteatom dokusunun farklı bölgelerinde MIB-1 ile heterojen boyanma paternleri yani farklı proliferatif kapasiteler gösterilmiştir. Epitelyal bölgelerde kolesteatom perimatrikse invaze oluyorsa daha yüksek oranda Ki-67 (+) hücreler tespit edilmiştir. Buna karşın DKY’de sadece skuamöz epitelin bazal tabakalarında Ki-67 (+) hücreler tespit edilmiştir. Retroauriküler ciltte de bazal tabakada zayıf Ki-67 (+) boyanma tespit edilirken, subkütanöz dokularda ve dermiste boyanma gözlenmemiştir. Bununla birlikte kıl folikülleri ve bezlerin çevresinde noktasal pozitif boyanmalar tespit edilmiştir. Işık mikroskopisi ile incelemede üç farklı nükleer boyanma paterni tespit edilmiştir. Bunlar granüler, yaygın ve karışık tip boyanma paternleridir. Kolesteatom örneklerinde granüler ve karışık tip boyanma paternleri baskınken, DKY cildi ve retroauriküler ciltte karışık ve yaygın tip boyanma paternlerine daha sık rastlanmıştır. Granüler boyanma paterni; nükleolus ve nükleoplazmada dağılmış değişik boyuttaki granüllerin boyanması sonucu ortaya çıkarken, yaygın boyanma paterni ise nükleoplazmanın boyanmasına işaret etmektedir. Bu çalışmada elde edilen diğer bir sonuç da Go dışında tüm hücre siklusu fazlarında Ki-67’nin salındığıdır. Bu sonuç kolesteatom epiteli için; hücre döngüsünün tüm aktif fazlarında görülürken, inaktif Go fazında görülmemesi nedeniyle, proliferasyonu belirlemekte Ki-67’nin uygun bir antijen olduğunun bilimsel kanıtını oluşturmaktadır. Ayrıca bu deneysel veriler Ki-67’nin hücre döngüsü ile ilişkili salınımının sabit olmadığını ve dinamik değişiklikler gösterdiğini de ortaya koymaktadır (12).

Bujia ve ark. çalışmalarında kolesteatom epitelinin DKY cildine göre daha yüksek oranda proliferasyon gösterdiğini, Ki-67 proteinine karşı kullanılan antikorlarla ortaya koymuşlardır (109). Olszewska ve ark. da kolesteatom epitelinin hiperproliferatif özelliklerini ortaya koymak amacıyla yapmış olduğu çalışmada, kolesteatom epitelinde PCNA ve Ki-67 salınımını normal cilt ile karşılaştırmıştır. Bu çalışmada hem Ki-67 hem de PCNA salınımının normal cilde göre kolesteatom epitelinde artmış olduğu tespit edilmiştir. Kolesteatom epitelinde proliferatif aktivitenin özellikle bazal ve suprabazal tabakalarda fazla olduğu ancak epitel kalınlığı ile ilişkisinin bulunmadığı ifade edilmektedir. Bizim yaptığımız çalışmada da Olszewska ve ark.’nın çalışmalarını destekler şekilde epitel kalınlığı ile hücre çoğalması arasında ilişki tespit edilmemiştir (111). Sudhoff

ve ark. ise yaptıkları çalışmada kolesteatom örneklerinde Ki-67 skorunu DKY cildine göre 2.3 kat daha fazla bulmuşlardır (%7'ye karşı %17) (40).

Çocukluk çağında görülen kolesteatomlar, erişkinlerde görülen kolesteatomlara göre daha hızlı büyüme göstermekte ve daha saldırgan bir davranış sergilemektedir. Bu nedenle çocukluk çağı kolesteatomlarında erişkinlere göre daha yüksek proliferasyon potansiyeli beklenir. Bujia ve ark. yapmış oldukları çalışmada, Ki-67 salınımının çocukluk çağında gözlenen kolesteatom olgularında yetişkinlerde görülen kolesteatom olgularına göre anlamlı düzeyde artmış olduğunu göstermişlerdir. Buna karşın Hildmann ve Sudhoff çocukluk çağı kolestatomları ile erişkin yaş gurubunda görülen kolesteatom örnekleri arasında Ki-67 salınımı açısından anlamlı bir farklılık olmadığını ifade etmektedirler (15,112).

Şanlı ve ark., tekrarlayan kolesteatomlu olgularda Ki-67 ekspresyonunu değerlendirdikleri çalışmada normal kolesteatomlu ve tekrarlayan kolesteatomlu olgularda Ki-67 salınımını kontrol gurubu olarak seçtikleri kronik otitis media nedeniyle timpanoplasti yapılan hastaların retroauriküler bölge deri örnekleri ile karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak bu çalışmada kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında kolesteatomlu her iki grupta da hücre proliferasyonunda artış tespit edilmiştir. Ki-67 boyanma yüzdeleri açısından, kolesteatomlu iki grup arasında anlamlı farklılık bulunmazken kolesteatomlu gruplar ile kontrol gurubu arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Bu anlamlı farklılığın tekrarlayan kolesteatomlu olgularda ileri derecede olduğu bildirilmektedir (13).

Choufani kolesteatom nedeniyle ameliyat edilen 55 hastada apoptozis, hücre proliferasyonu (Ki-67) ve p53 oranları ile kolesteatomun tekrarlama eğilimini incelemişlerdir. Hastaları Ki-67 ve apoptotik hücre oranlarına göre 4 gruba ayırmışlardır. Birinci grupta yüksek apoptotik, düşük proliferatif hastalar, 2. grupta yüksek apoptotik, yüksek proliferatif hastalar, 3. grupta düşük apoptotik, düşük proliferatif hastalar 4. grupta ise düşük apoptotik, yüksek proliferatif hastalar yer almıştır. En düşük p53 boyanma oranı 3. grupta (düşük apoptotik, düşük proliferatif) gözlenirken, en yüksek p53 boyanma oranı 2 grupta (yüksek apoptotik, yüksek proliferatif) gözlenmiştir. Rekürren kolesteatomlarda ise rekürrens göstermeyenlere göre daha yüksek apoptozis oranları tespit edilmiştir. Proliferasyon indeksi ile rekürrens arasında ise bir ilişki tespit edilmemiştir. Aynı zamanda rekürren vakalarda apoptotik hücrelerin homojen dağılım gösterdiği, tekrar etmeyen kolesteatomlarda ise heterojen dağılım gösterdiği tespit edilmiştir (54).

Huisman ve ark. kolesteatom ve normal deride, hücre çoğalması, hücre döngüsü ve apoptozis arasında farklılık olup olmadığını incelemiştir. Bu çalışmada 15 kolesteatomlu kronik otit olgusunda kolesteatomdan ve kontrol grubu olarak retroauriküler cilt dokusundan alınan örnekler Ki-67, p53, p21 ve aktif caspase 3 düzeyleri açısından karşılaştırılmıştır. Hücre ölümü ve proliferasyonunu düzenleyen genlerin en önemlilerinden birisi p53 gen proteinidir. Bu protein programlanmış hücre ölümünü düzenleyen caspase adı verilen proteazları aktive eder. Bu proteaz ailesinden olan aktif caspase 3 düzeyi apoptozise giden hücrelerin belirlenmesinde marker olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada apoptozise giden hücrelerin tespitinde kullanılan diğer bir yöntem de TUNEL tekniği ile doku örneklerinde apoptotik hücrelerin oranını hesaplamaktır. p21 proteini de, p53 tarafından aktive edildikten sonra hücrelerin G1 fazında kalmasını ve mitozu uğramamasını sağlayan bir siklin bağımlı kinaz inhibitörüdür. Bu çalışmada proliferasyon belirteci olarak da Ki-67 düzeyine bakılmıştır. Bu çalışmada incelenen 15 kolesteatom örneğinin 10'unda inflamatuvar hücreler ve bağ dokusunda yeni oluşan kan hücreleri gözlenirken, retroauriküler cilt kesitlerinde inflamasyon gözlenmemiştir. İmmünohistokimyasal analizde retroauriküler deride üst bazal tabakada Ki-67 (+) hücrelerin oranı %2-%13 arasında değişirken kolesteatom epitelinde ise Ki-67 (+) hücrelerin üst bazal ve daha az oranda suprabazal tabakalarda boyandıkları gözlenmiştir. Bağ dokusunda da Ki-67 (+) hücrelere rastlanmıştır. Kolesteatom örneklerinde Ki-67 (+) hücrelerin geniş bir varyasyon gösterdiği gözlenmiş ve bu dağılımın %1.7 ile %35.6 arasında değiştiği not edilmiştir. Ortalama olarak kolesteatom örneklerinde Ki-67 (+) hücrelerin oranı retroauriküler deri örneklerine göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Kolesteatom epitelindeki artmış proliferatif hücre oranları ise inflamasyonla ilişkili bulunmamıştır. İnflamasyon gözlenmeyen kolesteatom doku örneklerinde de artmış Ki-67 ekspresyonu tespit edilmiştir. Bu çalışmada p53 ve p21 boyanma oranları açısından da kolesteatom örneklerinde artmış boyanma oranı tespit edilmiştir. Ancak apoptozis oranını tespit etmekte kullanılan caspase 3 aktivitesi ve TUNEL metodunda tespit edilen pozitif hücre sayıları ihmal edilebilir düzeyde olduğu için istatistiksel olarak analiz edilememiştir. Bu durum kolesteatom örneklerinde apoptozis oranında bir artış olmadığı yorumunun yapılmasına neden olmuştur (9).

Mallet ve ark. kolesteatomun saldırganlığının epitelin hiperproliferatif özellikleri ile ilişkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada hastalar kemik erimesine göre iki gruba ayrılmıştır. İlk gruba sadece tek kemikçik yıkımı olanlar, ikinci gruba ise iki veya daha

fazla kemikçik yıkımı olanlar, kolesteatoma bağlı fasiyal sinir kanalında yeniklik, tegmen mastoideumda bütünlük kaybı, LSSK'da açıklık ve sigmoid sinüs üzerindeki kemik dokuda yeniklik olan hastalar dahil edilmiştir. Sonuç olarak ikinci grupta aktif proliferasyonun ilk guruba göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yine aktif proliferasyonun fazla olduğu örneklerde; inflamasyonun da yoğun olarak izlendiği bildirilmektedir. Çocuk yaş gurubundaki hastalarda da artmış proliferasyon oranları bildirilmiştir (113).

Yapmış olduğumuz çalışmada Mallet ve ark.'nın yapmış olduğu gibi hastaları; LSSK, fasiyal kanal, tegmen ve skutum açıklıklarından herhangi birisine sahip hastaların toplandığı kemik yıkımının genel komplikasyon gurubu ile bunların görülmediği hasta gurubu olarak ikiye ayırdık. Patolojik bulgular açısından karşılaştırıldığında (Langerhans skorları, Ki-67, apoptozis oranları, inflamasyon yoğunluğu ve epitel kalınlığı), iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü. Yıkılan kemikçikler yeniden sınıflandırıldığında ise kemikçik yıkımı olmayan ve sadece 1 kemikçik yıkımı olanlar bir guruba, 1'den fazla kemikçikte yıkımı olanlar ikinci guruba alındı. CD1a skorları, Ki-67 ve apoptozis skorları arasında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi. Bu sonuçlarda kullanmış olduğumuz klinik parametrelerin farklılıklar göstermesinin de etkisi olabileceğini düşünüyoruz.

Elde ettiğimiz bu bulgulara göre, çalışma amacının bir bölümünü oluşturan ve kolesteatomun yıkıcı özelliğinin tespitine yönelik parametrelerimizden Langerhans skorları, hücre çoğalması ve apoptozis oranlarının bu konuda yol gösterici olmadığı; saldırgan seyredecek kolesteatom olgularının tespitinde daha farklı belirteçlerin kullanıldığı daha fazla çalışmaya gereksinim olduğu sonucuna ulaşıldı.

Çalışmamızdaki patolojik parametrelerden inflamasyon yoğunluğu ve epitel kalınlığı ile Langerhans hücre skorları, Ki-67 ve apoptozis skorları karşılaştırıldığında ise; inflamasyonun yoğun olduğu grupta Ki-67 skorlarının da istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi. Elde edilen bu bulgu literatürdeki benzer çalışmalarla uyumluluk göstermektedir ve artmış olan inflamasyonun, hücre çoğalmasından sorumlu olduğu savını destekler niteliktedir.

Apoptozis organizma için önemli bir hücresel olaydır. Apoptozisin mekanizmasını anlamaya yönelik çalışmalar normal hücre gelişimini daha iyi anlayabilmenin yanı sıra Alzheimer Hastalığı, Huntington Hastalığı ve kolesteatom gibi hastalıkların

mekanizmalarının da daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Apoptozis immunolojik reaksiyonlar sırasında istenmeyen lenfositlerin uzaklaştırılması için zorunlu bir elemandır. Apoptozis aynı zamanda genetik olarak defektif hücrelerin uzaklaştırılmasına da rol oynar (1). Kolesteatomda keratinositlerin diferansiyasyonu sırasında artmış olan ölmüş hücreler keratin debrisleri olarak birikmektedir. DKY cildi ile karşılaştırıldığında keratinositlerdeki artmış olan hücre ölümü keratin debrislerinin birikiminin nedenidir. Bu süreç keratinositlerin terminal farklılaşmasının sonucudur ve apoptozis ile açıklanmaktadır (3).

Miyazaki ve ark. yapmış oldukları çalışmada kolesteatomdaki keratinositlerin terminal farklılaşma özelliklerini ortaya koymak için protein kinaz-C (delta), protein kinaz-C (eta), sitokeratin-1, sitokeratin-10 ve involukrin düzeylerini normal deri ile karşılaştırmışlardır. Bu proteinlerden protein kinaz-C (delta) ve protein kinaz-C (eta) hücre farklılaşmasında sinyal iletiminde kritik rol oynarken, involukrin farklılaşma belirteci olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada elde edilen bulgular kolesteatomdaki keratinositlerin terminal farklılaşması ile normal dokudaki keratinositlerin terminal farklılaşması arasında bir fark olmadığını ortaya koymaktadır. Elde edilen bu bulgulara dayanarak da kolesteatomda artmış olan hücre çoğalmasının normal olarak sonuçlanan terminal farklılaşma süreci ile dengelendiği yorumunu yapmışlardır (52).

Apoptozis sürecinde kaspaz-3, kaspaz-8 ve nükleer faktör (NF)-kappaB önemli rol oynamaktadır. Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-alfa) ve IL-1 gibi hücre dışı inflamatuvar sitokinlerin salınımı ile hücre içi sinyal uyarım sistemi aktive olur. Aktive olan kaspaz-8, kaspaz-3'ü aktive ederek ve TNF-alfa'nın hücre yüzey reseptörlerinin sayısını arttırarak, apoptozisi sağlamaktadır. Bu süreçte NF-kappaB, TNF-alfa'ya karşı oluşturulan hücresel cevaplar da anahtar rol oynar (51,114). Miyao ve ark. yapmış oldukları çalışmada kaspaz-8'in kolesteatom epidermisinin granüler tabakasında, kaspaz-3'ün ise hem granüler hem de spinöz tabakada gösterilmesine karşın, normal deride hem kaspaz-3'ü hemde kaspaz-8'in anlamlı boyanma göstermediğini ortaya çıkarmışlardır (51). Hücrelerin terminal farklılaşmasından (apoptozis) sorumlu bir diğer faktör olan kaspaz-14 düzeylerinin de kolesteatom dokusunda artmış olduğu gösterilmiştir (115). Bu çalışmalardan elde edilen bulgular da kolesteatomda apoptozisin artmış olduğu ve keratin debris birikiminin bu artan terminal farklılaşmaya bağlı olduğu görüşünü desteklemektedir.

Park ve ark.'nın çalışmasında kolesteatom epitelinde Fas/APO-1 salınımı incelenmiştir. Bu protein apoptozis ile ilişkili protein ailesindendir. Bu çalışmada da, retroauriküler cilt ile karşılaştırıldığında kolesteatom epitelinde daha yüksek oranda

apoptozise giden hücre tespit edilmiştir. Çalışmamızda da TUNEL yöntemi kullanılmıştır. Kolesteatom epitelinde apoptotik hücrelerin suprabazal tabakalarda daha fazla olduğu gözlenmiştir (116).

Olszewska ve ark. sekonder akkiz kolesteatom nedeniyle ameliyat olan 29 hastada kolesteatom epitelinin değişik katmanlarındaki apoptotik kapasitenin ortaya konması için bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada 14 hastadan operasyon sırasında alınan retroauriküler cilt örneği kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Tüm örneklerle bizim çalışmamızda olduğu gibi apoptozis için TUNEL yöntemi ile boya yapılmıştır. Apoptozis APO2.7 antijenine karşı kullanılan antikörlerle tespit edilmiştir. APO2.7 proteini mitokondrial membranda yerleşen ve apoptozisin erken fazlarında ortaya çıkan bir proteindir. Bu çalışmada epidermisi tüm katmanlarında (St. Bazale, St. Spinosum, St. Granülozum, St. Corneum) net bir şekilde tespit edilmiş ve APO2.7'nin ekspresyon paterni net olarak belirlenebilmiştir. DNA fragmentasyonu floresan mikroskobu altında tespit edilmiştir. Bu çalışmaya sadece cerrahi sırasında kolesteatom epitelinin tüm katmanının mevcut olduğu örnekler dahil edilmiştir. Kolesteatom örneklerinde lenfosit, nötrofil, makrofaj ve plazma hücrelerinden oluşan inflamasyonun varlığı tespit edilmiştir. Apoptotik cisimlerin hiperdens gruplar halinde görüldüğü bildirilmektedir. Apoptotik hücreler normal epitelin özellikle stratum granulozum takasında tespit edilmiştir. Fizyolojik olarak keratinsitler terminal farklılaşmaya gittikçe bazal tabakadan suprabazal tabakalara doğru hareket ederler ve stratum granulozuma ulaştıklarında yıkım süreci başlamaktadır. Dolayısı ile bu tabakadaki hücrelerde apoptozisin yoğun olarak tespit edilmesi normal fizyoloji ile uyumludur. Bu çalışmada kolesteatom epitelinde, kontrol grubuna göre daha yüksek oranda apoptotik hücre tespit edilmiştir. Ancak bu apoptotik hücrelerin bazal tabakada görülmediği bildirilmektedir. Rekürren kolesteatom nedeniyle opere edilen 5 hastanın ikisinde daha yüksek oranda apoptotik hücreye rastlamıştır. Ancak hasta sayıları istatistiksel analiz yapmak için yeterli değildir. Hastaların yaşları ve hastalık süreleri ile apoptotik hücre oranları arasında istatistiksel ilişki bulunmamıştır. Yazarlar apoptotik hücrelerin kolesteatom epitelinde normal cilde göre daha yüksek oranda gözlenmesini kolesteatom epitelinin hiperproliferatif özellikleri ile ilişkilendirmişlerdir. Yani programlanmış hücre ölümü (apoptozis) kolesteatom epitelinde mevcut olup, artmış hücre ölümü; artmış hücre proliferasyonunun sonucudur ve kolesteatom epitelinin bu hiperproliferatif davranışı kolesteatomun saldırgan seyrini belirler (1).

Kolesteatom ile ilgili çalışmalarda proliferatif sürecin özelliklerini belirlerken Ki-67 gibi parametrelerden yararlanılırken, epitelin apoptozis oranı da bu hiperproliferatif sürecin bir sonucu olarak değerlendirilmiştir. Ancak bizim yaptığımız bu çalışmada hem apoptozis hem de proliferasyon ile ilgili parametreler bir arada değerlendirilerek bunların birbirleri ile ve klinik parametrelerle ilişkileri de ortaya konulmaya çalışılmıştır. Çalışmamızda kolesteatom epitelinde artmış hücre proliferasyon oranları ve apoptozis oranları tespit edilmekle birlikte, artmış epitel kalınlığı ve infamasyon ile apoptozis arasında ilişki tespit edilmemiştir. Klinik parametrelerden tek anlamlı ilişki ise açık teknik yapılan olgularda Ki-67 indeksi ($p=0.041$) ve apoptozis yoğunluğunun ($p=0.032$) kapalı teknik kullanılanlara göre daha yüksek olmasıdır. Bu durum ise artmış hücre çoğalması ve apoptozis oranları kolesteatomun daha saldırgan seyri ile ilişkilendirildiği için, yapmış olduğumuz cerrahi tercihin isabetli olduğuna işaret etmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile konağın orta kulak kolesteatomlarına karşı yoğun Langerhans hücre infiltrasyonu ile yanıt verdiği, bu yanıtın kemik yıkımının dolaylı göstergeleri kabul edebileceğimiz Ki-67 ve ApopTag boyamaları ile desteklendiği bulunmuştur. Hücre çoğalması ve programlı hücre ölümünün daha yoğun olduğu olgulardaki tedavi seçeneğimiz olan açık tekniğin isabetli bir seçim olduğu görülmüştür.

SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Patolojik incelemede, Langerhans hücrelerinin kolesteatom epitelinde DKY cildine göre daha yoğun toplandığı, Ki-67 indeksinin kolesteatom epitelinde daha yüksek olduğu, apoptozisin kolesteatom epitelinde daha belirgin olduğu saptandı.
2. Patolojik parametrelerden inflamasyon yoğunluğu ve epitel kalınlığı ile Langerhans hücre skorları, Ki-67 ve apoptozis skorları karşılaştırıldığında; inflamasyonun yoğun olduğu grupta Ki-67 skorlarının anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi.
3. Klinik ve patolojik bulgular arasındaki tek anlamlı ilişki ise, açık teknik yapılan olgularda Ki-67 indeksi ve apoptozis yoğunluğunun kapalı teknik kullanılanlara göre daha yüksek olması idi. Bu durum ise yapmış olduğumuz cerrahi tercihin isabetli olduğuna işaret etmektedir.
4. Langerhans hücre skorlarının kolesteatomda artış gösterdiği, ancak bu durumun hastalığın klinik seyri için belirleyici olamayacağı sonucuna varıldı. Artmış olan Langerhans hücre skorlarının artmış epitelyal proliferasyonla ve daha destrüktif özellikler gösteren kolesteatom örnekleri ile kolerasyon göstermesi beklenebilir. Ancak yapmış olduğumuz çalışmada; inflamasyonun yoğun olduğu kolesteatom örnekleri ile inflamasyonun yoğun olmadığı kolesteatom örnekleri arasında Langerhans hücre skorları arasında bir farklılık tespit edilmedi.
5. LSSK, fasiyal kanal, tegmen ve skutum açıklıklarından herhangi birisine sahip hastaların toplandığı kemik yıkımının genel komplikasyon gurubu ile bunların görülmediği hasta gurubu patolojik bulgular açısından karşılaştırıldığında (Langerhans skorları, Ki-67, apoptozis oranları, inflamasyon yoğunluğu ve epitel kalınlığı), iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü.
6. Elde ettiğimiz bu bulgulara göre, çalışma amacının bir bölümünü oluşturan ve kolesteatomun yıkıcı özelliğinin tespitine yönelik parametrelerimizden Langerhans skorları, hücre çoğalması ve apoptozis oranlarının bu konuda yol gösterici olmadığı; saldırgan seyredecek kolesteatom olgularının tespitinde daha farklı belirteçlerin kullanıldığı daha fazla çalışmaya gereksinim olduğu sonucuna ulaşıldı.

KAYNAKLAR

1. Olszewska E, Chodynicky S, Chyczewski L. Apoptosis in the pathogenesis of cholesteatoma in adults. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2006; 263: 409-13.
2. Semaan MT, Megerian CA. The pathophysiology of cholesteatoma. *Otolaryngol Clin North Am.* 2006; 39(6): 1143-59.
3. Olszewska E, Wagner M, Bernal-Sprekelsen M, Ebmeyer J, Dazert S, Hildmann H, Sudhoff H. Etiopathogenesis of cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2004; 261(1): 6-24.
4. Gantz BJ. Epidermal Langerhans cells in cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1984; 93:150-6.
5. Choufani G, Roper N, Delbrouck C, Hassid S, Gabius HJ. Animal model for cholesteatoma induced in the Gerbil: Will the profiles of differentiation/growth-regulatory markers be similar to the clinical situation? *Laryngoscope.* 2007; 117(4): 706-11.
6. Palva T, Taskinen E. Langerhans' cells in chronic otitis media. *Acta Otolaryngol.* 1987; 103(5-6): 448-50.
7. Söker S. Dentritik hücreler. *Dicle Tıp Dergisi.* 2005; 32(3): 158-60.
8. Gallo O, Libonati GA, Gallina E, Fini-Storchi O, Giannini A, Urso C, Bondi R. Langerhans cells related to prognosis in patients with laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1991; 117(9): 1007-10.
9. Huisman MA, De Heer E, Grote JJ. Cholesteatoma epithelium is characterized by increased expression of Ki-67, p53 and p21, with minimal apoptosis. *Acta Otolaryngol.* 2003; 123: 377-82.
10. Bujia J, Sudhoff H, Holly A, Hildmann H, Kastenbauer E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen middle ear cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1996; 253: 21-4.
11. Olszewska E, Lautermann J, Koc C, Schwaab M, Dezert, Hildmann H, Sudhoff H. Cytokeratin expression pattern in congenital and acquired pediatric cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2005; 262(9): 731-36.
12. Raynov AM, Moon SK, Choung YH, Hong SP, Park K. Nucleoplasm staining patterns and cell cycle-associated expression of Ki-67 in middle ear cholesteatoma. *Am J Otolaryngol.* 2005; 26: 296-301.

13. Şanlı A, Tezer İ, Paksoy M, Aydın S, Hardal Ü, Özdemir NB. Tekrarlayan kolesteatomlu olgularda Ki-67 ekspresyonunun değerlendirilmesi. Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg. 2007; 17(2): 65-69.
14. Lee SH, Jang YH, Tae K, Park YW, Kang MJ, Kim KR, Park CW. Telomerase activity and cell proliferation index in cholesteatoma. Acta Otolaryngol. 2005; 125(7): 707-12.
15. Bujia J, Holly A, Antoli-Candela F, Tapia MG, Kastenbauer E. Immunobiological peculiarities of cholesteatoma in children: quantification of epithelial proliferation by MIB1. Laryngoscope. 1996; 106: 865-8.
16. Kemppainen HO, Puhakka HJ, Laippala PJ, Sipila MM, Manninen MP, Karma PH. Epidemiology and aetiology of middle ear cholesteatoma. Acta Otolaryngol. 1999; 119: 568-72.
17. Hildmann, H. Sudhoff, and K. Jahnke. Principles of an Individualized Approach to Cholesteatoma Surgery. In: Jahnke K. Ed. Current Topics in Otolaryngology Head and Neck Surgery. Middle Ear Surgery. Recent Advances and Future Directions. Thieme. Stuttgart, 2004. p. 73-93.
18. Tos M. Incidence, etiology and pathogenesis of cholesteatoma in children. Adv Otorhinolaryngol. 1988; 40: 110-7.
19. Soldati D, Mudry A. Knowledge about cholesteatoma, from the first description to the modern histopathology. Otol Neurotol. 2001; 22(6): 723-30.
20. Jahn AF. Cholesteatoma: What is it, how it get there, and how do we get rid of it? Otolaryngol Clin North Am. 1989; 22(5): 847-57.
21. Tos M. Manuel of middle ear surgery. 1993; Thieme, Stuttgart, Newyork.
22. Meyerhoff WL, Truelson J. Cholesteatoma staging. Laryngoscope 1986; 96: 935-9.
23. Mills RP, Padgham ND. Management of childhood cholesteatoma. J Laryngol Otol. 1991; 105: 343-5.
24. Saleh HA, Mills RP. Classification and staging of cholesteatoma Clin Otolaryngol. 1999; 24: 355-9.
25. Derlacki EL, Clemis JD. Congenital cholesteatoma of the middle ear and mastoid. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1965; 74: 706-27.
26. Levenson MJ, Michaels L, Parisier SC, Juarbe C. Congenital cholesteatomas in children: an embryologic correlation. Laryngoscope. 1988; 98(9): 949-55.
27. Michaels L. An epidermoid formation in the developing middle ear: possible source of cholesteatoma. J. Otolaryngol. 1986; 15: 169-74.

28. Bennett M, Warren F, Jackson GC, Kaylie D. Congenital cholesteatoma: Theories, facts, and 53 patients. *Otolaryngol Clin North Am.* 2006; 39: 1081-94.
29. Kojima H, Miyazaki H, Shiwa M, Tanaka Y, Moriyama H. Molecular biological diagnosis of congenital and acquired cholesteatoma on the basis of differences in telomere length. *Laryngoscope.* 2001; 111(5): 867-73.
30. Nelson M, Roger G, Koltai PJ, Garabedian E-N, Triglia J-M, Roman S, Castellon RJ, Hamel JP. Congenital cholesteatoma: classification, management, and outcome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002; 128: 810-4.
31. Tos M. A new pathogenesis of mesotympanic (congenital) cholesteatoma. *Laryngoscope.* 2000; 110 (11): 1890-7.
32. Koltai PJ, Nelson M, Castellon RJ, Garabedian E-N, Triglia J-M, Roman S, Roger G. The natural history of congenital cholesteatoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002; 128: 804-9.
33. Sadé J. Cellular differentiation of the middle ear lining. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1971; 80(3): 376-83.
34. Palva T. The pathogenesis and treatment of cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.* 1990; 109(5-6):323-30.
35. Kim HJ, Chole RA. Experimental models of aural cholesteatomas in Mongolian gebrils. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1998; 107(2): 129-34.
36. Sudhoff H, Tos M. Pathogenesis of attic cholesteatoma: clinical and immunohistochemical support for combination of retraction theory and proliferation theory. *Am J Otol.* 2000; 21(6): 786-92.
37. Sudhoff H, Tos M. Pathogenesis of sinus cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2007; 264(10): 1137-43.
38. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2001. 14; 358(9276): 135-8.
39. Chole RA, Faddis BT. Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002; 128(10): 1129-33.
40. Sudhoff H, Bujia J, Fisseler-Eckhoff A, Schulz-Flake C, Holly A, Hildmann H. Expression of the cell cycle related antigen (MIB-1) in cholesteatoma and auditory meatal skin. *Laryngoscope.* 1995; 105(11): 1227-31.
41. Park K, Park HJ, Chun YM. Immunohistochemical study on proliferative activity of experimental cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2001; 258(3): 101-5.
42. Desloge RB, Carew JF, Finstad CL, Steiner MG, Sassoon J, Levenson MJ, Staiano-Coico L, Parisier SC, Albino AP. DNA analysis of human cholesteatomas. *Am J Otol.* 1997; 18:155-9.

43. Lavezzi A, Mantovani M, Cazzulo A, Turconi P, Matturri L. Significance of trisomy 7 related to PCNA index in cholestaatoma. *Am J Otolaryngol*. 1998; 19(2): 109-12.
44. Tokuriki M, Noda I, Saito T, Narita N, Sunaga H, Tsuzuki H, Ohtsubo T, Fujieda S, Saito H. Gene expression analysis of human middle ear cholesteatoma using complementary DNA arrays. *Laryngoscope*. 2003; 113(5): 808-14.
45. Kwon KH, Kim SJ, Kim HJ, Jung HH. Analysis of gene expression profiles in cholesteatoma using oligonucleotide microarray. *Acta Otolaryngol*. 2006; 126(7): 691-7.
46. Albino AP, Reed JA, Bogdany JK, Sassoon J, Desloge RB, Parisier SC. Expression of p53 in human middle ear cholesteatomas. *Am J Otol*. 1998; 19: 30-6.
47. Selim AG, El-Ayat G, Naase M, Wells CA. C-myc oncoprotein expression and gene amplification in apocrine metaplasia and apocrine change within sclerosing adenosis of the breast. *Breast*. 2002; 11: 466-72.
48. Ozturk K, Yildirim MS, Acar H, Cenik Z, Keles B. Evalation of c-myc status in primary acquired cholesteatoma by using fluorescence in situ hybridization technique. *Otol Neurotol*. 2006; 27: 588-91.
49. Holly A, Sittinger M, Bujia J. Immunohistochemical demonstration of c-myc oncogene product in middle ear cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1995; 252: 366-9.
50. Polakowska RP, Placentini M, Bartlett R, Goldsmith LA, Hake AR. Apoptosis in human skin development: morphogenesis periderm and stem cells. *Dev Dynamics*. 1994; 199: 176-88.
51. Miyao M, Shinoda H, Takahashi S. Caspase-3, caspase-8, and nuclear factor-kappaB expression in human cholesteatoma. *Otol Neurotol*. 2006; 27(1): 8-13.
52. Miyazaki H, Kojima H, Tanaka Y, Shiwa M, Koga T, Moriyama H. Terminal differentiation of epithelial cells in middle ear cholesteatoma: investigation of patterns of expression of protein kinase C-delta and protein kinase C-eta. *Laryngoscope*. 1999; 109(11): 1785-92.
53. Kojima H, Tanaka Y, Tanaka T, Miyazaki H, Shiwa M, Kamide Y, Moriyama H. Cell proliferation and apoptosis in human middle aear cholsteatoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998; 124(3): 261-4.
54. Choufani G, Mahillon V, Decaestecker C, Lequeux T, Danguy A, Salmon I, Gabius HJ, Hassid S, Kiss R. Determination of the levels of expression of sarcolectin and calcyclin and of the percentages of apoptotic but not proliferating cells to enable distinction between recurrent and nonrecurrent cholesteatomas. *Laryngoscope*. 1999; 109(11): 1825-31.

55. Olszewska E, Sudhoff H. Comparative cytokeratin distribution patterns in cholesteatoma epithelium. *Histol Histopathol.* 2007; 22(1): 37-42.
56. Bujia J, Holly A, Schilling V, Negri B, Pitzke P, Schulz P. Aberrant expression of epidermal growth factor receptor in aural cholesteatoma. *Laryngoscope.* 1993; 103: 326-9.
57. Bujia J, Holly A, Kim C, Sudhoff H, Ostos P, Kastenbauer E. Epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human middle ear cholesteatoma: An analysis of protein production and gene expression. *Am J Otol.* 1996; 17: 1-4
58. Sudhoff H, Bujia J, Holly A, Kim C, Fisseler-Eckhoff A. Functional characterization of middle ear mucosa residues in cholesteatoma samples. *Am J Otol.* 1994; 15: 217-21.
59. Barbara M, Raffa S, Murè C, Manni V, Ronchetti F, Monini S, Torrisi MR. Keratinocyte growth factor receptor (KGF-R) in cholesteatoma tissue. *Acta Otolaryngol.* 2008; 128(4): 360-4.
60. Ergün S, Zheng X, Carlsöö B. Expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in middle ear cholesteatoma. *Am J Otol.* 1996; 17(3): 393-6.
61. Bujía J, Stammberger M, Holly A, Kastenbauer E. Profile of anti-stratum corneum auto antibodies in patients with aural cholesteatoma. *Am J Otol.* 1994; 15(4): 532-5.
62. Palva T, Taskinen E. Inflammatory cells in chronic middle ear disease. Value of lymphocyte subset determination in ear surgery. *Acta Otolaryngol.* 1990; 109(1-2): 124-9.
63. Ottaviani F, Neglia CB, Berti E. Cytokines and adhesion molecules in middle ear cholesteatoma. A role in epithelial growth? *Acta Otolaryngol.* 1999; 119: 462-7.
64. Huisman MA, de Heer E, Ten Dijke P, Grote JJ. Transforming growth factor beta and wound healing in human cholesteatoma. *Laryngoscope.* 2008; 118(1): 94-8.
65. Sudhoff H, Bujía J, Borkowshi G, Koc C, Holly A, Hildmann H, Fisseler-Eckhoff A. Basement membrane in middle ear cholesteatoma. Immunohistochemical and ultrastructural observations. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1996; 105(10): 804-10.
66. Parisier SC, Agresti CJ, Schwartz GK, Han JC, Albino AP. Alteration in cholesteatoma fibroblasts: induction of neoplastic-like phenotype. *Am J Otol.* 1993; 14: 126-30.
67. Sudhoff H, Dazert S, Gonzales AM, Borkowski G, Park SY, Baird A, Hildmann H, Ryan AF. Angiogenesis and angiogenic growth factors in middle ear cholesteatoma. *Am J Otol.* 2000; 21(6): 793-8.

68. Chole RA, McGinn MD, Tinling SP. Pressure-induced bone resorption in the middle ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1985; 94: 165-70.
69. Jung JY, Chole RA. Bone resorption in chronic otitis media: the role of the osteoclast. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2002; 64(2): 95-107.
70. Cinamon U, Kronenberg J, Benayahu D. Structural changes and protein expression in the mastoid bone adjacent to cholesteatoma. *Laryngoscope*. 2000; 110: 1198–203.
71. Suzuki C, Ohtani I. Bone destruction resulting from rupture of a cholesteatoma sac: temporal bone pathology. *Otol Neurotol*. 2004; 25: 674-7.
72. Schimdt M, Grunsfelder, Hoppe F. Induction of matrix metalloproteinases in keratinocytes by cholesteatoma debris and granulation tissue extracts. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2000; 257: 425–9.
73. Schimdt M, Grunsfelder, Hoppe F. Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in middle ear cholesteatoma: correlations with growth factor expression in vivo? *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2001; 258: 472–6.
74. Mehta D, Daudia A, Birchall JP, Banerjee AR. The localization of matrix metalloproteinases-8 and-13 in cholesteatoma, deep-meatal and postauricular skin: a comparative analysis. *Acta otolaryng*. 2007; 127: 138-42.
75. Richardson AC, Tinling SP, Chole RA. Risedronate activity in the fetal and neonatal mouse. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993; 109: 623–33.
76. Yoon TH, Lee SH, Park MH, Chung JW, Kim HJ. Inhibition of cholesteatomatous bone resorption with pamidronate sodium. *Acta Otolaryngol*. 2001; 121: 178-81.
77. Bennett M, Warren F, Haynes D. Indications and technique in mastoidectomy. *Otolaryngol Clin N Am*. 2006; 39: 1095-113.
78. Syms MJ, Luxford WM. Management of cholesteatoma: status of the canal wall. *Laryngoscope*. 113(3): 443-8.
79. Donhoff JL. Retrograde mastoidectomy. *Otolaryngol Clin N Am*. 2006; 39: 1115-27.
80. Mehta RP, Harris JP. Mastoid obliteration. *Otolaryngol Clin N Am*. 2006; 39: 1129-42.
81. Donhoff JL. Cartilage tympanoplasty. *Otolaryngol Clin N Am*. 2006; 39: 1161-76.
82. El-Kashlan H, Parker LA. Tympanoplasty and ossiculoplasty. In Cummings CW, editor. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 4th edition. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005. p. 3058-73.

83. Javia LR, Ruckenstein MJ. Ossiculoplasty. *Otolaryngol Clin N Am.* 2006; 39: 1177-89.
84. Yung MW. Literature review of alloplastic materials in ossiculoplasty. *J Laryngol Otol* 2003; 117: 431–6.
85. Dost P, Jahnke K. Biomaterials in reconstructive middle ear surgery. In: Jahnke K, editor. *Current topics in otolaryngology-head and neck surgery: middle ear surgery, recent advances and future directions.* New York: Thieme; 2004. p. 53–72.
86. Brackmann DE. Tympanoplasty with mastoidectomy: canal wall up procedures. *Am J Otol.* 1993; 14: 380.
87. Osma U, Cureoglu S, Hosoglu S. The complications of chronic otitis media: report of 93 cases. *J Laryngol Otol.* 2000; 114(2): 97-100.
88. Smith JA, Danner CJ. Complications of chronic otitis media and cholesteatoma. *Otolaryngol Clin North Am.* 2006; 39(6): 1237-55.
89. Harker LA, Shelton C. Complications of temporal bone infections. In: Cummings CW, editor. *Cummings otolaryngology head and neck surgery.* 4th edition. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005. p. 3013–38.
90. Sennaroglu L, Sozeri B. Otogenic brain abscess: review of 41 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000; 123(6): 751–5.
91. Veldman JE, Meeuwse F, van Dijk M, Key Q, Huizing EH. Progress in temporal bone histopathology. II. Immuno-technology applied to the temporal bone. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1985; 423: 29-35.
92. van Dijk CM, Visser CE, Veldman JE. Spatial distribution of Langerhans' cells and T-lymphocyte subpopulations in human tympanic membrane and aural cholesteatoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1986; 52(2): 143-52.
93. Hussl B, Egg G, Romani N, Kong W, Schrott-Fischer A. Dendritic cells in the normal human tympanic membrane. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995; 104: 803-7.
94. Rowden G, Boudreau S, Higley H. Langerhans cells and extra-epidermal dendritic cells. An investigation in laboratory animals and man with immunomorphological methods. *Scand J Immunol.* 1985; 21(5): 471-8.
95. Takahashi S, Nakano Y. Immunohistochemical demonstration of Langerhans' cell in cholesteatoma using an antiserum against S-100 protein. *Arch Otorhinolaryngol.* 1989; 246(1): 48-52.
96. Mayot D, Béné MC, Faure GC, Wayoff M, Perrin C. Immunohistologic analysis of the cholesteatoma matrix in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 1991; 22(2): 115-24.

97. Kamide Y, Sasaki H, Abramson M, Huang CC. Effects of epidermal Langerhans cell's conditioned medium on keratinocytes: a role of Langerhans cells in cholesteatoma. *Am J Otolaryngol.* 1991; 12(6): 307-15.
98. Aberg B, Jontell M, Edstrom S. Analysis of class II antigen expressing cells in cholesteatoma epithelium. *Acta Otolaryngol.* 1988; 106(3-4): 186-91.
99. Park K. Significance of Langerhans' cells in middle ear cholesteatoma. *Yonsei Med J.* 1994; 35(4): 438-45
100. Palva T, Taskinen E. Langerhans' cells in chronic otitis media. *Acta Otolaryngol.* 1987; 103(5-6): 448-50.
101. Chao WY, Jin YT, Huang CC. Langerhans cells in human middle ear cholesteatomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1992; 249(7): 380-4.
102. Prosperi E. Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen: DNA replication, repair and cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 1997; 3: 193-210.
103. Harrison RF, Reynolds GM, Rowlands DC. Immunohistochemical evidence for the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) by non-proliferating hepatocytes adjacent to metastatic tumours and in inflammatory conditions. *J Pathol.* 1993; 171: 115-22.
104. Lynch DA, Clarke AM, Jackson P, Axon AT, Dixon MF, Quirke P. Comparison of labelling by bromodeoxyuridine, MIB-1, and proliferating cell nuclear antigen in gastric mucosal biopsy specimens. *J Clin Pathol.* 1994; 47: 122-5.
105. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983; 31: 13-20.
106. Scholzen T, Gerdes J, The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182: 311-22.
107. Starborg M, Gell K, Brundell E, et al. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci* 1996; 109: 143-53.
108. Mayot D, Bene MC, Perin C, et al. Restricted expression of Ki-67 in cholesteatoma epithelium. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993; 119: 656-8.
109. Bujia J, Holly A, Sudhoff H, Antoli-Candela F, Tapia MG, Kastenbauer E. Identification of proliferating keratinocytes in middle ear cholesteatoma using the monoclonal antibody Ki-67. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 1996; 58: 23-6.
110. Campana D, Coutan-Smith E, Janossy G. 'Cytoplasmic' expression of nuclear antigens. *Leukemia.* 1989; 3: 239-40.

111. Olszewska E, Chodynicky S, Chyczewski L, Rogowski M. Some markers of proliferative activity in cholesteatoma epithelium in adults. *Med Sci Monit.* 2006; 12(8): CR337-40.
112. Hildmann H, Sudhoff H. Cholesteatoma in children: *Int J Pediat Otorhinolaryngol.* 1999; 49(Suppl 1): S81-6.
113. Mallet Y, Nouwen J, Lecomte-Houcke M, Desaulty A. Aggressiveness and quantification of epithelial proliferation of middle ear cholesteatoma by MIB1. *Laryngoscope.* 2003; 113: 328-31.
114. Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev.* 1998; 12: 1551–70.
115. Jung MH, Lee JH, Cho JG, Jung HH, Hwang SJ, Chae SW. Expressions of caspase-14 in human middle ear cholesteatoma. *Laryngoscope.* 2008; 118(6): 1047-50.
116. Park HJ, Park K. Expression of FAS/APO-1 and apoptosis of keratinocytes in human cholesteatoma. *Laryngoscope.* 1999; 109: 613-6.