

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ
ANABİLİM DALI

**PEDİATRİK VE ERİŞKİN HASTALARDA
KOLESTEATOM AKTİVİTESİNİN
PROLİFERASYON, ANJİOGENEZ VE
APOPTOZ BELİRTEÇLERİ İLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

MUSTAFA ASLIER

UZMANLIK TEZİ

İZMİR - 2014

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ
ANABİLİM DALI

**PEDİATRİK VE ERİŞKİN HASTALARDA
KOLESTEATOM AKTİVİTESİNİN
PROLİFERASYON, ANJİOGENEZ VE
APOPTOZ BELİRTEÇLERİ İLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ
MUSTAFA ASLIER

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. TANER KEMAL ERDAĞ

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	iii
RESİM LİSTESİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
1. ÖZET	6
2. SUMMARY	8
3. GİRİŞ VE AMAÇ	10
4. GENEL BİLGİLER	11
5. GEREÇ VE YÖNTEM	14
5.1. Hasta Seçimi	15
5.2. Kemik Defeklerinin Belirlenmesi.....	15
5.3. Klinik Verilerin Belirlenmesi.....	16
5.4. Patolojik Verilerin Değerlendirilmesi	18
5.4.1. Boyama Protokolü	18
5.4.1.1. Hematoksilen Eozin boyama.....	18
5.4.1.2. Ki-67 (MİB-1) boyama	18
5.4.1.3. CD-31 (PECAM) boyama.....	18
5.4.1.4. Kaspaz-3 (E-8) boyama	19
5.4.2. Mikroskopik İnceleme	19
5.4.2.1. Epitel Kalınlığı.....	19
5.4.2.2. Ki-67 (MİB-1).....	19
5.4.2.3. CD-31 (PECAM).....	19
5.4.2.4. Kaspaz-3 (E-8).....	20
5.5. İstatistiksel Analiz	20
6. BULGULAR	25
6.1. Genel Özellikler.....	25
6.2. Klinik Ve Biyolojik Değerlendirme	26
6.2.1. Kemikçik defektleri.....	26
6.2.1.1. Malleus - İnkus – Stapes.....	26
6.2.1.1.1. Malleus	26
6.2.1.1.2. İnkus.....	26
6.2.1.1.3. Stapes.....	26
6.2.1.2. Fasiyal Kanal	27

6.2.1.3.	LSSK	27
6.2.1.4.	Tegmen.....	27
6.2.2.	<i>Klinik verilerin değerlendirilmesi</i>	28
6.2.2.1.	Pediyatrik Hasta Grubu	28
6.2.2.2.	Erişkin Hasta Grubu.....	28
6.2.2.3.	Hastalık Tipi	28
6.2.2.4.	Ameliyat Tekniği	29
6.2.3.	<i>Grupların Karşılaştırması</i>	31
6.2.4.	<i>Korelasyon Analizleri</i>	32
7.	TARTIşMA.....	34
8.	SONUÇ.....	47
9.	KAYNAKLAR	48

TABLO LİSTESİ

Tablo-1 Çalışma izlem şeması

Tablo-2 Kemik Skoru

Tablo-3 OKRİ ve AK skorları

Tablo-4 Hastaların Genel Özellikleri

Tablo-5 Kemik Defektlerinin Yerleşimi

Tablo-6 Hastalık tipi ve nüksleri içeren Fisher'in kesin ki-kare testi

Tablo-7 Hastalık tipi ve hasta yaşlarını içeren Fisher'in kesin ki-kare testi

Tablo-8 Hastalık tipi ile klinik ve patolojik verilerin oranları

Tablo-9 Cerrahi tipi ve nüksleri içeren Pearson'un ki-kare testi

Tablo-10 Cerrahi tipi ve hasta yaşlarını içeren Pearson'un ki-kare testi

Tablo-11 Cerrahi tipi ile klinik ve patolojik verilerin oranları

Tablo-12 Hasta yaşları ve nüksleri içeren Pearson'un ki-kare testi

Tablo-13 Hasta yaşları ile klinik ve patolojik verilerin oranları

Tablo-14 Nüks varlığı ile klinik ve patolojik verilerin oranları

Tablo-15 Klinik skorların korelasyonunda Kendall'ın iki değişkenli korelasyon analizi

Tablo-16 Klinik ve patolojik skorların korelasyonunda Kendall'ın iki değişkenli

korelasyon analizi

Tablo-17 Patolojik skorların korelasyonunda Kendall'ın iki değişkenli korelasyon analizi

RESİM LİSTESİ

Resim-1 X20 büyütmede 15 mikronmetre kalınlığında epitel

Resim-2 X10 büyütmede 128 mikronmetre kalınlığında epitel

Resim-3 X20 büyütmede %9 Ki-67 boyama

Resim-4 X10 büyütmede %54 Ki-67 boyama

Resim-5 X10 büyütmede CD-31 ile boyanmış mikrodamar yapıları

Resim-6 X20 büyütmede kaspaz-3 ile negatif boyanma

Resim-7 X20 büyütmede yoğun kaspaz-3 ile pozitif boyanma

KISALTMALAR

AAH: Attikoantral hastalık

ADKM: Arka duvar korunmuş mastoidektomi

ADİM: Arka duvar indirilmiş mastoidektomi

AK: Austin Kartush

HE: Hematoksilen eozin

KD: Kemik defekti

KS: Kemik Skoru

LSSK: Lateral semisirküler kanal

MAK: Maksimum

MİN: Minimum

MM: Metalloproteinaz

OKRİ: Orta kulak risk indeksi

ORT: Ortalama

SK: Sitokeratin

SS: Standart sapma

TTH: Tübotimpanik hastalık

1. ÖZET

PEDİATRİK VE ERİŞKİN HASTALARDA KOLESTEATOM AKTİVİTESİNİN PROLİFERASYON, ANJİOGENEZ VE APOPTOZ MARKIRLARI İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Mustafa Aslıer

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı

Amaç

Bu çalışmada pediatrik ve erişkin hastalarda kolesteatomun biyolojik aktivitesi, klinik özellikleri ile karşılaştırılarak araştırıldı.

Yöntem

Çalışmaya 1993-2013 yılları arasında kolesteatomlu otitis media nedeniyle mastoidektomi uygulanmış 61 hasta dahil edildi. Hastaların klinik ve cerrahi özellikleri, takip süreleri ve kolesteatom nüksleri hasta dosyaları incelenerek belirlendi. Histopatolojik incelemeler, hastalardan cerrahi sırasında alınmış ve parafin bloklarında arşivlenmiş dokulardan hazırlanan yeni kesitler üzerinde yapıldı. Kolesteatomun klinik aktivitesi 'Orta Kulak Risk İndeksi' (OKRİ), 'Austin-Kartush Sınıflaması' (AK) ve nüks oranları ile değerlendirildi. Kemik erozyonunu değerlendirmek için orta kulak kemikçikleri, tegmen, fasiyal kanal ve lateral semisirküler kanalda (LSSK) gelişmiş kemik defektlerini içeren 'Kemik Skoru' (KS) oluşturuldu. Kolesteatomun biyolojik aktivitesini değerlendirmek için epitel kalınlığı, Ki-67, kaspaz-3 ve CD-31 immünohistokimyasal boyamaları yapıldı.

Bulgular

Çalışmaya 25 pediatrik ve 36 erişkin toplam 61 hasta dahil edildi. Ortalama takip süresi 27,2 ay saptandı. Ortalama %27,9 nüks gelişimi izlendi. Pediatrik grupta %44 ve erişkin grupta %16,7 oranında nüks kolesteatom tespit edildi (p:0.019). OKRİ, AK ve KS erişkin grupta daha fazla saptanmasına karşın bu farklar istatistiksel

olarak anlamlı bulunmadı. Histopatolojik veriler incelendiğinde epitel kalınlığı ve Ki-67 erişkin, CD-31 ise pediatrik hasta grubunda istatistiksel açıdan anlamlı şekilde yüksek saptandı (sırasıyla p:0.009, p:0.01 ve p:0.037). Korelasyon analizlerinde OKRİ, AK ve KS'lerinin birbirleri arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon elde edildi (herbiri için p:0,001). Histopatolojik veriler karşılaştırıldıklarında sadece Ki-67 ve epitel kalınlığı arasında pozitif anlamlı korelasyon elde edildi.

Sonuç

Kolesteatom nüksü pediatrik hastalarda ve kolesteatomun hiperproliferatif özelliği erişkin hastalarda daha belirgin saptandı. Bu bulgular pediatrik hastalarda kolesteatomun agresif seyrinin histopatolojik özelliklerden kaynaklandığı görüşünü desteklememektedir.

Anahtar kelimeler: Kolesteatom, İmmünohistokimya, Kaspaz-3, CD-31, Ki-67, Mastoid, Pediatrik, Erişkin, Cerrahi

2. SUMMARY

ASSESSMENT OF CHOLEASTEATOMA ACTIVITY WITH PROLIFERATION, ANGIOGENESIS AND APOPTOSIS MARKERS IN PEDIATRIC AND ADULT PATIENTS

Dr. Mustafa Aslier

Dokuz Eylul University Department of Otolaryngology

Aim

In this study, biological activity of cholesteatoma was investigated in pediatric and adult patients by comparing their clinical characteristics.

Methods

Sixty one patients who underwent mastoidectomy due to chronic otitis media with cholesteatoma between 1993-2013 were included. The data of clinical and surgical characteristics, follow-up durations and recidivism rates were collected from medical records of the patients. Histopathological examinations were performed on new sections which were taken during surgery and prepared from archived tissues in paraffin blocks. Clinical activity of cholesteatoma was evaluated by Middle Ear Risk Index (MERI), Austin-Kartush Classification (AK) and recidivism rates. A scoring system called 'Bone Score' (BS) which include bone defects in the middle ear ossicles, tegmen, facial canal and the lateral semicircular canal (LSSC) was developed to estimate bony erosion. In order to evaluate biological activity of cholesteatoma; immunohistochemical staining for epithelial thickness, Ki-67, caspase-3 and CD-31 was performed.

Results

A total of 61 patients, 25 pediatric and 36 adult, were included in the current study. Mean follow up was 27.2 months. The overall rate of recidivism was 27,9%. The recidivism rates were 44% and 16.7% in pediatric and adult patients respectively (p:0.019). Even though MERI, AK and BS found to be higher among adult patients,

this difference did not indicate any statistical significance. Epithelial thickness and Ki-67 percentage were higher in adult patients, whereas staining for CD 31 was higher in pediatric patients (p:0.009, p:0.01 and p:0.037 respectively). Correlation analysis showed significant positive correlation within MERI, AK classification and BS (p:0.001 for each of them). Positive significant correlation was noted only between Ki-67 percentage and epithelial thickness when histopathological data were compared (p:0.001).

Conclusion

Despite the fact that we observed recidivism rate of cholesteatoma more common in pediatric patients, hyperproliferative characteristic of cholesteatoma was more presented in adult patients. These findings do not support the idea that aggressive clinical course of cholesteatoma is a result of its histopathological characteristics in pediatric patients.

Key Words: Adult, Cholesteatoma, Caspase-3, CD-31, Immunohistochemistry, Ki-67, Mastoid, Pediatric, Surgery

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolesteatom temporal kemiğin havalı boşlukları içerisinde skuamöz hücreli epitelden gelişen, yoğun keratin debrisleri içeren, benign fakat lokal destrüktif özelliği nedeniyle önemli bir kulak burun boğaz hastalığıdır. Patogenezinin epitel dokusunda artmış proliferasyon ve keratin üretimi sorumludur ⁽¹⁾. Bu süreç enflamatuvar yanıtı tetikler. Sonuç olarak artan sitokin ve enzim düzeyleri kemik erozyonuna sebep olur ^(2,3). Kolesteatomun klinik öneminden sorumlu mekanizma da bu kemik destrüksiyonudur.

Kolesteatom pediatrik hastalarda daha agresif bir seyir göstermekle birlikte nüks oranları da yine pediatrik popülasyonda daha fazladır ^(4,5). Kolesteatomun aktivitesini hastalığın biyolojik aktivitesi ile ilişkilendirmiş birçok çalışma yapılmış ve bu konuda farklı görüşler oluşmuştur. Kimi yazarlar pediatrik hastalarda kolesteatomun biyolojik aktivitesinin nüks ve komplikasyon oranlarını artırabileceğini vurgulamakta fakat bir kısım yazar ise biyolojik aktiviteden çok hastalık süresinin önemli bir risk oluşturduğuna inanmaktadır ⁽⁶⁾.

Bu çalışmada pediatrik ve erişkin hastalardan oluşan popülasyonda kolesteatomun klinik ve biyolojik aktivitesi incelendi. Kolesteatomlu kronik otit nedeniyle mastoidektomi uygulanmış ve en az 6 ay süre ile takip edilmiş hastaların klinik özelliklerine dosyalarından ulaşıldı. Hastaların cinsiyetleri, yaşları, hastalık tipleri [Attikoantral hastalık (AAH) ya da tübotimpanik hastalık (TTH)] ve cerrahi özellikleri [Arka duvar korunmuş mastoidektomi (ADKM) ya da arka duvar indirilmiş mastoidektomi (ADİM)], orta kulak kemikçiklerinin durumu, fasiyal kanal, tegmen ve lateral semisirküler kanal defektleri belirlendi. Kolesteatomun klinik aktivitesini göstermek üzere tüm hastaların OKRİ, AK, kemikçik erozyonunun durumunu skorlayan KS ve nüks durumları saptandı. Hastaların operasyonları sırasında histopatolojik inceleme amaçlı alınan örnekler üzerinde yapılan immünohistokimyasal boyamalar ile biyolojik aktiviteleri incelendi. Kolesteatom matriksinde proliferasyon için epitel kalınlığı ve Ki-67, apoptoz için kaspaz-3 ve perimatriksinde anjiogeneze için CD-31 immünomarkırları kullanıldı. Pediatrik ve erişkin hastalarda klinik skorlar ile histopatolojik özellikler karşılaştırıldı. Ayrıca klinik ve histopatolojik verilerin kendi içlerinde ve birbirleri ile korelasyonları değerlendirildi.

4. GENEL BİLGİLER

Kolesteatom temporal kemiğin havalı hücreleri içerisinde, skuamöz hücreli epitelden gelişen ve merkezinde keratin debrisler içeren epidermal inklüzyon kistidir. İlk kez 1829 yılında Cruvelhhier tarafından makroskopik görünümü nedeniyle temporal kemiğin ‘İnci Tümörü’ olarak tanımlanmış ve 1838 yılında Müller tarafından kolesterin ve yağ içerdiği düşünülerek ‘Kolesteatom’ ismi verilmiştir. Modern tanımı ile kolesteatom temporal kemiğin havalı hücreleri içerisinde, keratinize skuamoz hücreli epitelden gelişmiş keratin kümesidir ⁽¹⁾.

Histopatolojik özellikleri ile benign bir kitle olmasına karşın çevre kemik dokuda oluşturduğu yoğun enflamasyon ve kemik erozyonu nedeniyle önemli bir hastalıktır. Temporal kemik içerisinde gelişen havalanma bozukluğu ve hipoksinin tetiklediği epitel proliferasyonu kısır bir döngü şeklinde artarak devam eder. Kolesteatom matriksinde gelişen proliferasyon sonucunda artan keratin debris çevre yumuşak dokuda kronik enflamasyona sebep olur. Enflamasyon sonucu ortamda artan sitokin ve osteolitik enzimler kemik erozyonundan sorumludur ^(2,3). Kolesteatomun klinik seyri hemen her hastada farklı olmakla birlikte özellikle pediatrik yaş grubunda seyri daha agresiftir ve nüks oranları fazla saptanmıştır ^(4,5). Pediatrik hasta grubunda kliniğin daha ağır olmasını hastalığın biyolojik olarak daha aktif olmasına bağlayan çalışmalar yanında biyolojik olarak fark olmadığı sonucuna ulaşan çalışmalar da mevcuttur ⁽⁶⁾.

Lim ve Saunders kolesteatomun histopatolojik özelliklerini belirlemişlerdir. Bazal membranın üzerinde epitel hücrelerinden oluşan matriks tabakası bulunur. Matriks stratum bazale, stratum spinozum, stratum granülozum ve stratum korneumdan oluşmaktadır ⁽⁷⁾. Bazal tabakada germinatif hücreler bulunur ve bu hücrelerden başlayan ve supra bazal tabakalarda apoptoz ile sonlanan hücre döngüsü epitel kalınlığını değiştirebilir. Proliferasyon fazla ise epitel hücreleri matürasyonunu tamamlamadan suprabazal tabakalara ilerleyecek ve bu sayede matriksin selüler tabakasının kalınlığı artacaktır. Proliferasyon ve diferansiyasyonun son aşamasında epitel hücreleri periferde ilerledikçe sitoplazmalarında keratin kümeleri oluşur ve stratum korneum tabakasında sadece aselüler keratin toplulukları izlenir. Matriksin dışında ise enflamatuar hücrelerden zengin bağ dokusu karakterinde perimatriks

olarak adlandırılan tabaka bulunur ⁽⁷⁾. Perimatrikste var olan enflamasyon özellikle kemik erozyonundan sorumlu tutulmaktadır.

Kolesteatom epitelinde yapılan çalışmalarda proliferatif süreci aydınlatmak için büyüme faktörleri üzerinde durulmuş ve bu çalışmaların bir kısmında proliferasyonun immünomarkırı olarak Ki-67 antijeni kullanılmıştır. Ki-67 ribozomal RNA transkripsiyonundan sorumlu bir nükleer proteindir. Hücre siklusunun G1, S, G2 ve M fazlarında aktive olarak hücre bölünmesinde görev alır ^(8,9). Ki-67 mitoz aşamasındaki hücrelerin nükleuslarında fizyolojik olarak artmış olduğu için kolesteatom matriksinde bazal hücrelerin hemen hepsinde saptanabilir. Bu nedenle Ki-67 ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda suprabazal yerleşimli hücrelerin değerlendirmeye alınması daha uygun olacaktır. Suprabazal tabakada artmış olan proliferatif sürecin nedeni ise enflamasyon ve büyüme faktörleridir.

CD-31 mikrovasküler damar endotelinde bulunan immünohistokimyasal markırdır ve tümör anjiogenezinde tanımlanmıştır ^(10,11). Kolesteatomda gelişen hipoksik süreç, doku hasarı ve artan enflamatuar hücreler, vasküler ve endotelyal büyüme faktörleri aracılığı ile anjiogenezi tetikler. Subepitel dokuda yani perimatrikste artan anjiogenez kolesteatom aktivitesinin biyolojik markırlarından biri sayılabilir ^(11,12).

Kolesteatom içerisinde bulunan keratinositlerin normal cilde oranla artmış apoptotik özelliği bilinmektedir ve bu süreç artmış proliferasyon ile açıklanmıştır ⁽¹³⁻¹⁵⁾. Kaspazlar sistein proteaz ailesindendir ve apoptoz kaskadından sorumludur. Apoptoz sırasında tümör nekroz faktörü alfa kaspaz-8'i, kaspaz-8 kaspaz-3'ü ve son aşamada kaspaz-3 apoptotik nükleazları aktifleştirir ⁽¹⁶⁾. Miyao ve ark.'nın yaptıkları çalışmada kolesteatomda kaspaz-3 aktivitesini artmış saptamışlar ve bu süreci keratin debrisin birikimi ve enflamasyonla ilişkili bulmuşlardır ⁽¹⁶⁾.

Kolesteatomun oluşturduğu enflamatuar reaksiyonlar sonrası artan sitokin ve osteolitik enzim düzeyleri çevre kemik dokuda destrüksiyona sebep olur. Gelişen bu kemik erozyonunun yaygınlığını değerlendirmek için kabul edilmiş bir parametre bulunmamakla birlikte en sık kullanılan sınıflama Austin-Kartush kemik evreleme sistemidir. 1972 yılında Austin kemikçik zincir defektlerini 4 gruba ayırmıştır: (1) malleus manubriumu ve stapes suprastruktürünün korunduğu, (2) malleus manubriumunun korunduğu ve stapes suprastruktürünün erode olduğu, (3) malleus

manubriumunun erode olduğu ve stapes suprastruktürünün korunduğu, (4) malleus manubriumu ve stapes suprastruktürünün erode olduğu ⁽¹⁷⁾. 1994 yılında Kartush sınıflamayı revize etmiş ve attik fiksasyon ile stapes taban fiksasyonunu sınıflamaya eklemiştir ⁽¹⁸⁾. Bu sınıflama temelde orta kulak mekaniği için önemli kemik yapıların durumunu belirler ve kemikçik zincir rekonstrüksiyonu uygulanacak hastalarda kullanılmaktadır. Kemik erozyonunun yaygınlığı hakkında sınırlı bilgi verir. Çalışmada AK sınıflaması orta kulak kemikçiklerinin durumunu göstermek ve diğer klinik parametreler ile korelasyonunu incelemek için kullanıldı. AK sınıflaması kolesteatomun komplikasyonlarından sorumlu olan çevre kemik dokuların erozyonu hakkında bilgi vermez.

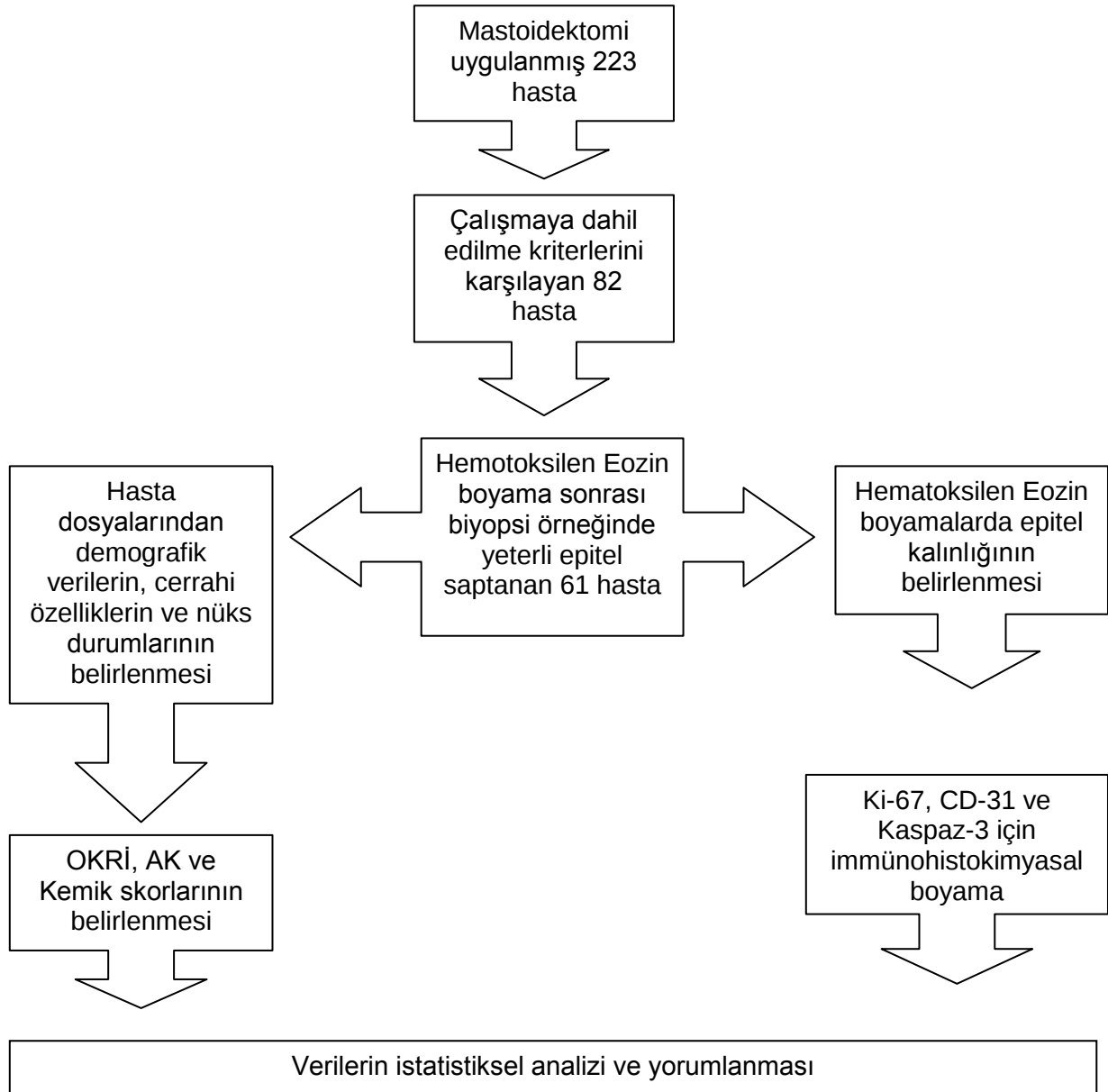
Tegmen, fasyal kanal ve otik kapsülü (özellikle LSSK) değerlendirebilmek için daha geniş içerikli bir evreleme oluşturuldu. Bu evrelemede her üç kemikçiğin salim, kısmi ya da tam erozyonu 0-1-2 olarak skorlandı. Tegmen, fasyal kanal ve otik kapsülde kısmi erozyonun cerrahi sırasında fark edilememesi olasılığı nedeniyle bu bölgelerde saptanan kemik defektler 2 puan şeklinde skorlandı. Bu şekilde 0 ile 12 aralığında değişen bir parametre oluşturuldu. 'Kemik Skoru' olarak adlandırılan bu sınıflama her hastanın cerrahi bulguları incelenerek hesaplandı.

Çalışmada hastalığın klinik değerlendirmesinde kullanılan diğer bir parametre ise OKRİ'dir. Kartush 1994 yılında timpanoplasti hastalarında prognoz belirleyicisi olarak cerrahi öncesi ve cerrahi sırasında elde edilen bazı verileri kullanarak bir sınıflama oluşturmuştur. 2001 de tekrar revize edilen bu indekste ameliyat öncesi kulak akıntısı (Belluci sınıflaması), zar perforasyonunun varlığı, kolesteatom varlığı, kemikçik zincirin durumu (AK sınıflaması), orta kulakta granülasyon ve efüzyon varlığı, önceki cerrahinin varlığı (revizyon ya da evrelendirilmiş cerrahi) ve sigara içiminin yer aldığı parametreler mevcuttur ⁽¹⁹⁾. Tüm bu parametreler kullanılarak 0 ile 15 aralığında değişen sonuç elde edilir ve bu sonuca göre hafif, orta ve ağır hastalıktan bahsedilir. Bu çalışmada OKRİ skoru kullanılmış, hastaların evresi değerlendirmeye alınmamıştır.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'nun 2013/17-15 numaralı kararı ile alınan etik kurul onayı ile çalışma başlatıldı. Çalışma izlem şeması Tablo-1 de verildi.

Tablo-1 Çalışma izlem şeması



5.1. Hasta seçimi

Bu çalışmada 1992 - 2013 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda kolesteatomlu kronik otit nedeniyle mastoidektomi uygulanmış 223 hastanın dosyaları geriye dönük olarak incelendi. Primer ameliyat sırasında biyopsi alınmış, en az altı ay süre ile takip edilmiş ve verilerine eksiksiz ulaşılabilen 82 hastanın ameliyatları sırasında alınmış biyopsi örneklerinden yeni kesitler hazırlandı. HE boyama yapılarak immünohistokimyasal boyama yapılabilecek yeterlilikte epitel dokusu içeren 61 hastanın preparatları çalışmaya dahil edildi.

Primer ameliyatı sırasında biyopsi alınmamış, takip süresi 6 aydan kısa, verileri eksik, HE boyama sonrası yeterli epitel izlenmeyen ve immünohistokimyasal incelemelerde biyopsi örnekleri uygunsuz boyanan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

Hastaların cinsiyetleri, yaşları, klinik bilgileri, ameliyat ve takip özellikleri gibi verilerine Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Arşivi'nden temin edilen dosyalarından ve ameliyat sırasında alınan biyopsilerine Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı Arşivi'nde saklanan parafin bloklarından ulaşıldı. Yaşı 18'in altında olanlar pediatrik ve 18 ile 18 üstü olanlar erişkin hasta grubunda değerlendirildi.

5.2. Kemik defeklerinin belirlenmesi

Hastaların dosyalarından ameliyat notları incelenerek kemik defektlerine yönelik verilere ulaşıldı. Ameliyatları sırasında orta kulak kemikçiklerinde, fasiyal kanalda, tegmende ya da LSSK'de kolesteatoma bağlı gelişmiş kemik erozyonu gözlenmedi ise kemik yapı sağlıklı olarak değerlendirmeye alındı. Ameliyat sırasında fasiyal kanalda, tegmende ya da LSSK'de kemik defekt saptandı ise kemik yapıda tam erozyon varlığı kabul edildi. Bu defektlerin anatomik lokalizasyonları ve boyutları değerlendirmeye alınmadı. Orta kulak kemikçiklerinin herhangi bir anatomik kısmında kolesteatoma bağlı defekt saptandı ise kısmi erozyon ve kemikçikler tamamen erozyona uğramış ve ameliyat sırasında tanınamamış ise tam kemik erozyonu olarak değerlendirildi. Stapesin sadece kaputuna sınırlı kemik defekti mevcutsa kısmi erozyon, caput ve krusların tamamen erode olduğu durumda ise tam erozyon kabul

edildi. Kemik erozyonları tespit edildikten sonra veriler OKRİ, AK ve KS'nin belirlenmesinde kullanıldı.

5.3. Klinik verilerin belirlenmesi

Hastaların demografik verileri belirlendikten sonra OKRİ, AK ve kemik defektlerini belirleyen parametreler kaydedildi. Klinik değerlendirme için OKRİ ve AK kullanıldı. OKRİ için 2001 yılında modifiye edilmiş güncel skrolama sistemi kullanıldı. AK sınıflamasına kemikçiklerin attikte fiksasyonu ve stapes tabanı fiksasyonu dahil edilmedi.

Bu parametrelere orta kulak kemik destrüksiyonunu gösterebilmek için kemikçik zincir, tegmen, otik kapsül ve fasiyal kanal erozyonunu gösteren bir evreleme sistemi dahil edildi. Bu evrelemede her üç kemikçığın durumu ayrı ayrı değerlendirildi. Kemikçığın salim olması durumunda 0, kısmi erozyonun varlığı durumunda 1 ve tam erozyonun varlığı durumunda 2 puan ile skorlandı. Fasiyal kanal, otik kapsül ve tegmen defektlerinde kısmi erozyonun saptanamama olasılığı ve sadece tam erozyonun gözlenebilmesi durumu nedeniyle bu bölgelerdeki defektler 2 puan ile skorlandı. Bu şekilde 0 ile 12 aralığında değişen bir skrolama sistemi oluşturuldu. 'Kemik Skoru' olarak adlandırılan bu evreleme her hasta için peroperatif bulgular göz önüne alınarak hesaplandı. OKRİ 0-15, AK 0-4 ve KS 0-12 değişken aralıklarında hesaplandı. Kemik Skoru Tablo-2 ve OKRİ ile AK Tablo-3'de verildi.

Tablo-2 Kemik Skoru

Malleus	
Salim	0
Kısmi erozyon	1
Tam erozyon	2
İnkus	
Salim	0
Kısmi erozyon	1
Tam erozyon	2
Stapes	
Salim	0
Kısmi erozyon	1
Tam erozyon	2
Tegmen	
Salim	0
Açık	2
Otik kapsül	
Salim	0
Açık	2
Fasyal kanal	
Salim	0
Açık	2

Tablo-3 OKRİ ve AK

OKRİ	Skor
Otore	
Kuru	0
Aralıklı akıntı	1
Persistan akıntı	2
Sürekli akıntı ve damak deformitesi	3
Perforasyon	
Yok	0
Var	1
Kolesteatom	
Yok	0
Var	1
AK	
M+ İ+ S+	0
M+ İ- S+	1
M+ İ- S-	2
M- İ- S+	3
M- İ- S-	4
Orta Kulakta Granülasyon Dokusu/ Efüzyon	
Yok	0
Var	2
Önceki Cerrahi	
Yok	0
Evrelenmiş	1
Revizyon	2
Sigara	
Yok	0
Var	2

5.4. Patolojik verilerin değerlendirilmesi

Ameliyat sırasında alınmış ve %10 formaldehit içerisinde tespit edilerek Dokuz Eylül Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı Arşivi'nde parafin bloklar şeklinde arşivlenen biyopsi örnekleri üzerinde çalışıldı. Çalışmaya katılma kriterlerini karşılayan hastaların parafin bloklarından yeni kesitler alındı. HE boyama kesitlerinde aselüler keratin içeren örnekler çalışma dışı bırakıldı. HE boyamalarında yeterli epitel dokusu saptanan 61 örnekte immünohistokimyasal boyamalar yapıldı.

5.4.1. Boyama protokolü

5.4.1.1. Hematoksilen eozin boyama

Dokular xylol solüsyonu içerisinde 10 dakika bekletilerek deparafinize edildi. Ardından saf, %95, %80 ve %70 alkol solüsyonları içerisinde 10'ar dakika bekletilerek dehidrate edildi. Hematoksilen boya içerisinde 5 dakika bekletildikten sonra su ile yıkandı. Asit alkol içerisinde birkaç saniye bekletilen dokular tekrar su ile yıkandı. Sonrasında Eozin boya içerisinde 3-4 dakika kadar bekletildi. Fazla eozinin uzaklaştırılması için %70, %80 ve %95 alkol solüsyonlarına daldırılıp çıkarıldı. Saf alkol içerisinde 20 dakika kadar bekletildikten sonra son olarak 3 kez 10'ar dakika kadar xylol solüsyonlarında bekletildi ve kurutuldu.

5.4.1.2. Ki-67 (MIB-1) boyama

Kesitler 52 dakika 95°C CC1 (cell conditioning 1) solüsyonunda bekletildi ve ardından Dako marka Ki-67 (MIB-1) kullanıma hazır (predilüe) solüsyon içerisinde 32 dakika inkübe edilerek hazırlandı. Boyamalar Benchmark Ultra cihazda Ultraview Universal DAB Detection kit kullanılarak yapıldı.

5.4.1.3. CD-31 (PECAM) boyama

Kesitler 52 dakika 95°C CC1 (cell conditioning 1) solüsyonunda bekletildi ve ardından Innovex Biosciences marka PECAM'dan (MAB346P) 1/50 dilüsyon oranında hazırlanan solüsyon içerisinde 32 dakika inkübe edilerek hazırlandı. Boyamalar Benchmark Ultra cihazda Ultraview Universal DAB Detection kit kullanılarak yapıldı.

5.4.1.4. Kaspaz-3 (E-8) boyama

Kesitler 64 dakika 95⁰C CC1 (cell conditioning 1) solüsyonunda bekletildi ve ardından Santa Cruz Biotechnology marka Kaspaz-3 (E8, SC-7272) 1/50 dilüsyon oranında hazırlanan solüsyon içerisinde 32 dakika inkübe edilerek hazırlandı. Boyamalar Benchmark Ultra cihazda Ultraview Universal DAB Detection kit kullanılarak yapıldı.

5.4.2. Mikroskopik inceleme

5.4.2.1. Epitel kalınlığı

Ki-67 boyalı kesit görüntüleri Nikon Eclips Ci mikroskopta görüntülenerek Nikon DS-Fi2 kamera ile digitalize edilerek bilgisayara aktarıldı. Bilgisayar ekranında orijinal büyütme x 20'de kalibre edilen kameraya ait görüntü analizi yazılımı kullanılarak, epitel kalınlığı bazal membrandan yüzeye dik çizgiler şeklinde 20 alanda ölçüldü ve yazılım tarafından hesaplanan ortalama, kalınlık olarak mikronmetre cinsinden belirlendi.

5.4.2.2. Ki-67 (MIB-1)

Ki-67 boyalı kesit görüntüleri Nikon Eclips Ci mikroskopta orijinal büyütme x 20'de görüntülenerek Nikon DS-Fi2 kamera ile digitalize edilerek bilgisayara aktarıldı. Bilgisayar ekranında kameraya ait görüntü analizi yazılımı kullanılarak, epitel bazalinden yüzeyine tüm alanları kapsayacak biçimde Ki-67 pozitif ve negatif hücre çekirdekleri üzerine ayrı ayrı bilgisayar faresi ile tıklanarak 1000 hücre sayımı sağlandı ve pozitif hücre yüzdesi belirlendi. Bazal hücreler, fizyolojik Ki-67 boyanma olması nedeniyle değerlendirilmeye alınmadı.

5.4.2.3. CD-31 (PECAM)

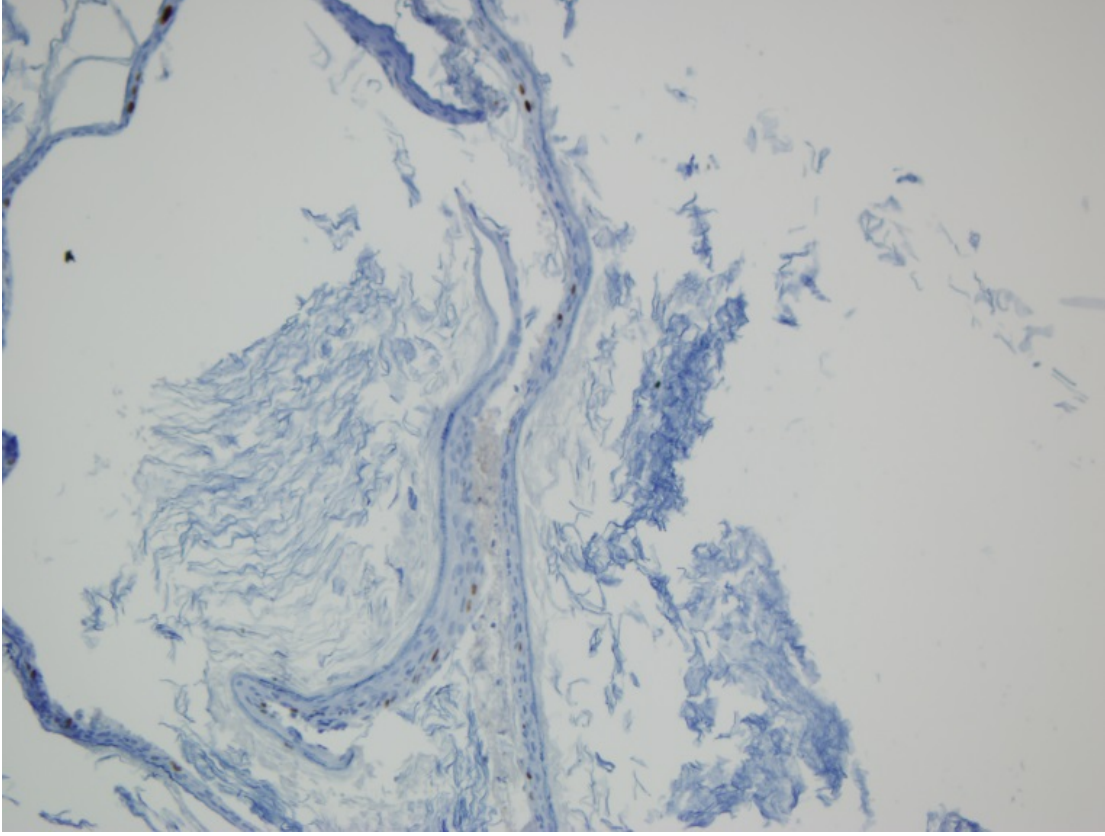
CD-31 boyalı kesit görüntüleri Nikon Eclips Ci mikroskopta görüntülenerek Nikon DS-Fi2 kamera ile digitalize edilerek bilgisayara aktarıldı. Bilgisayar ekranında orijinal büyütme x 20'de kesit alanındaki CD-31 ile boyanmış mikrodamar sayısı belirlendi.

5.4.2.4. Kaspaz-3 (E-8)

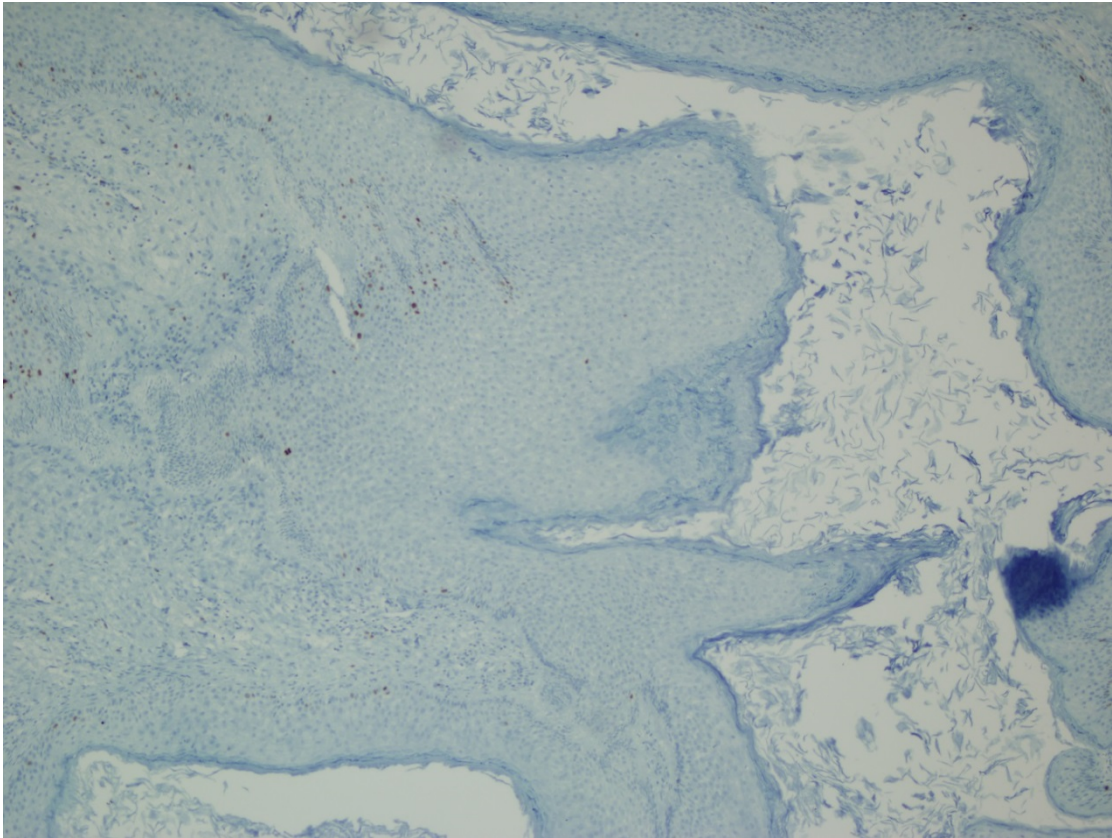
Kaspaz-3 boyalı kesit görüntüleri Nikon Eclips Ci mikroskopta görüntülenerek Nikon DS-Fi2 kamera ile digitalize edilerek bilgisayara aktarıldı. Bilgisayar ekranında orijinal büyütme x 20'de kesit görüntüleri sitoplazmik pozitiflik açısından değerlendirilerek zayıf boyanma ve hiç boyanma olmaması durumu negatif, güçlü boyanma olması ise pozitif olarak değerlendirildi.

5.5. İstatistiksel Analiz

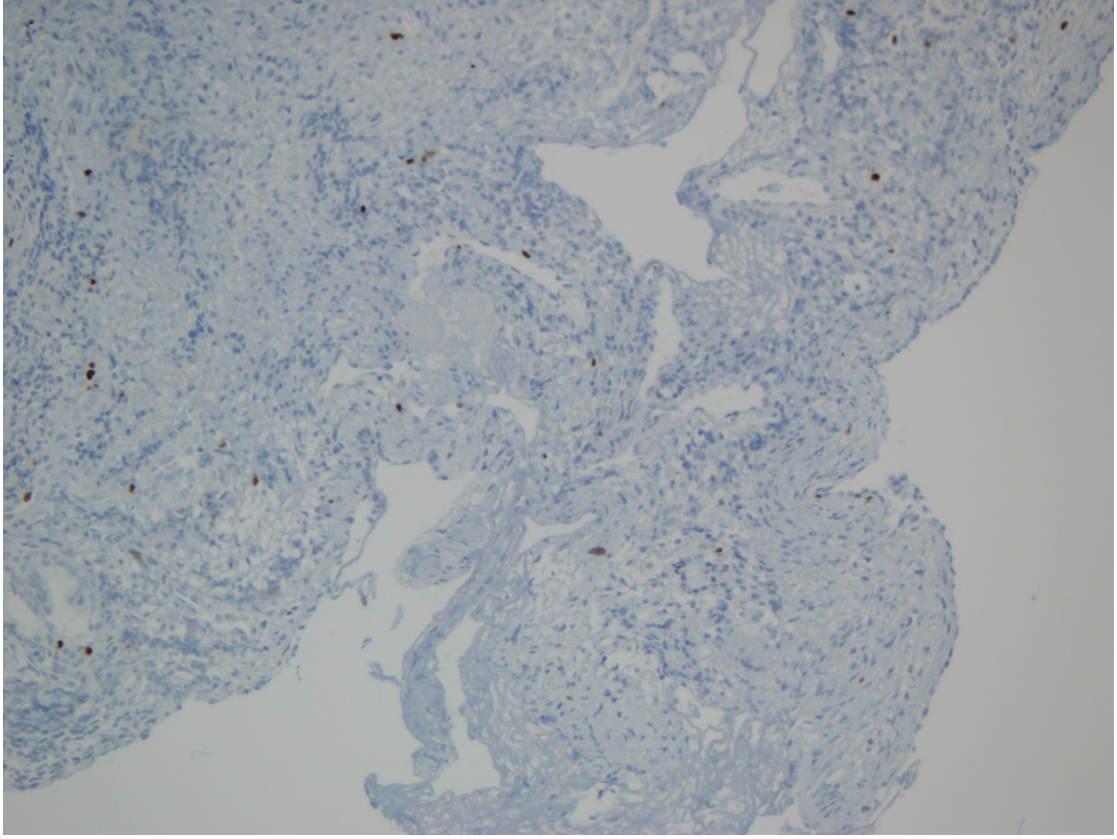
Elde edilen sonuçların analizinde SPSS 15.0 istatistik programı kullanıldı. Ortalama değerler ile standart sapmaları hesaplandı. Ölçülebilen değişkenlerin ortalama değerleri Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Sayımla belirlenen kategorik değişkenler Ki-kare testi ile değerlendirildi. Skor verilerek oluşturulan değişkenler arasındaki korelasyon analizlerinde Kendall's tau-b ve ölçüm yapılarak hesaplanan değişkenler arasındaki korelasyon analizlerinde ise Pearson testleri kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi.



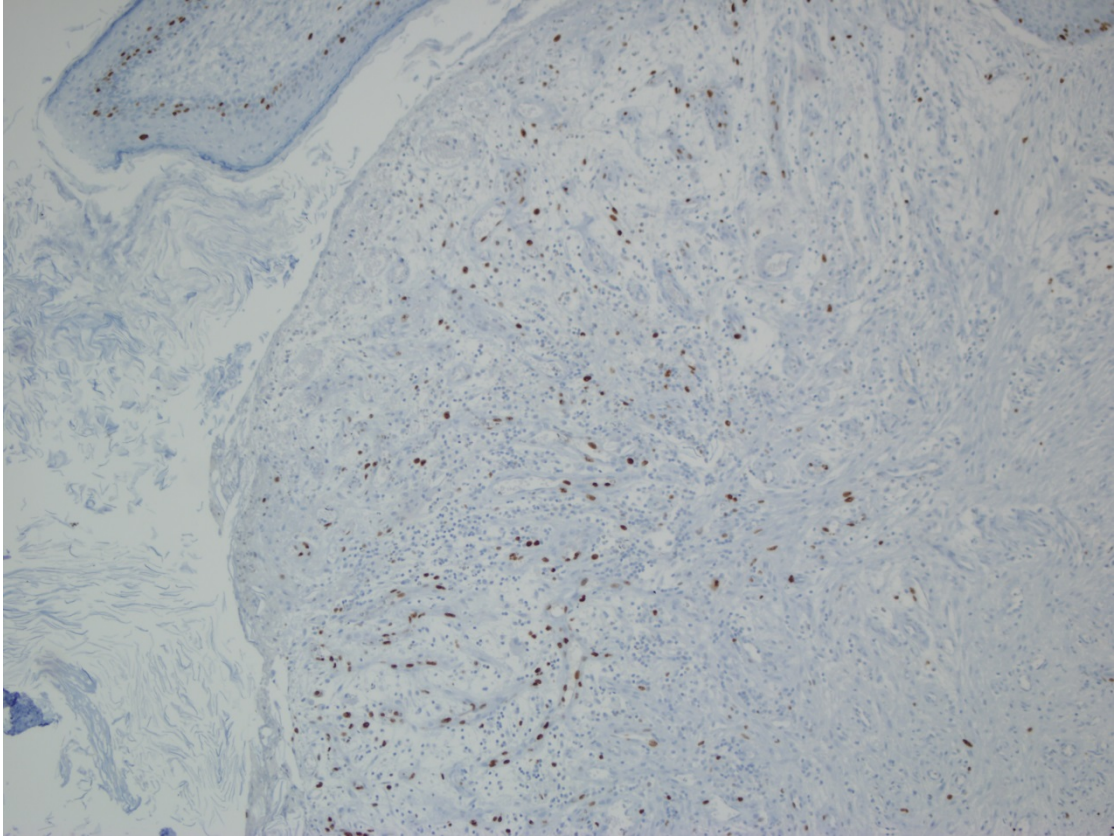
Resim-1 X20 büyütmede 15 mikronmetre kalınlığında epitel



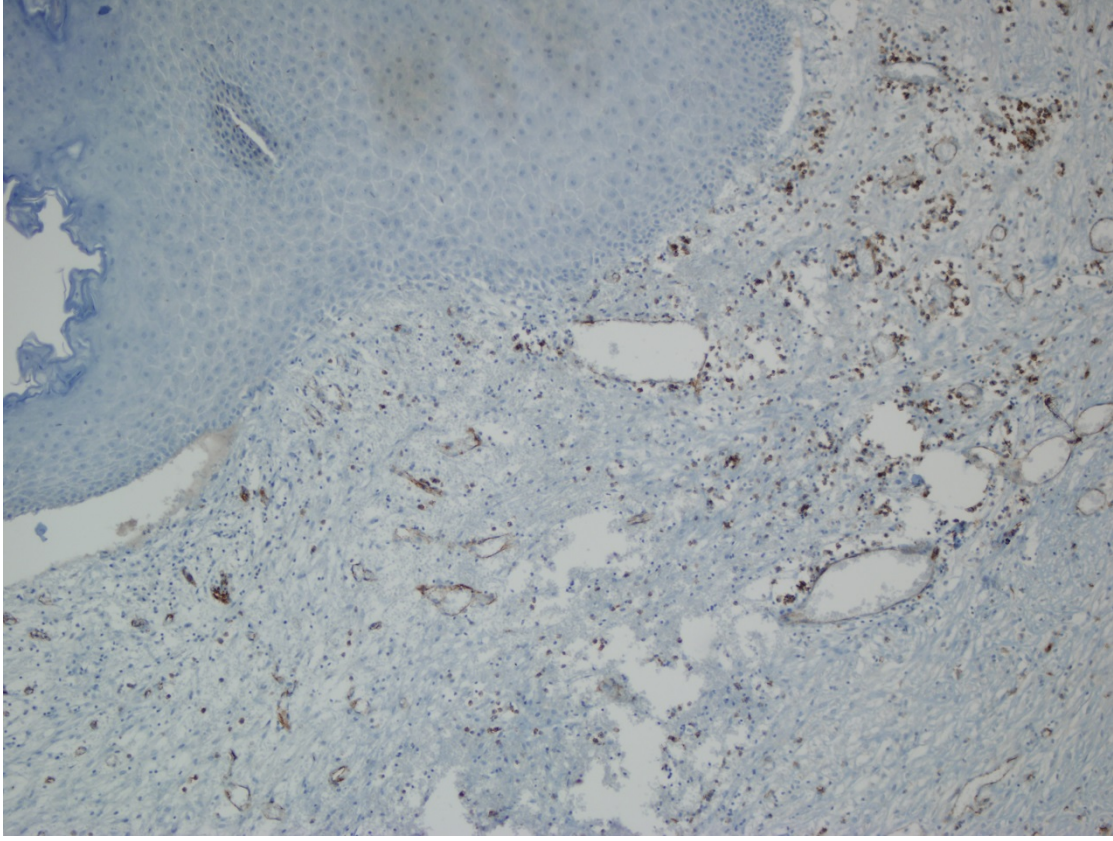
Resim-2 X10 büyütmede 128 mikronmetre kalınlığında epitel



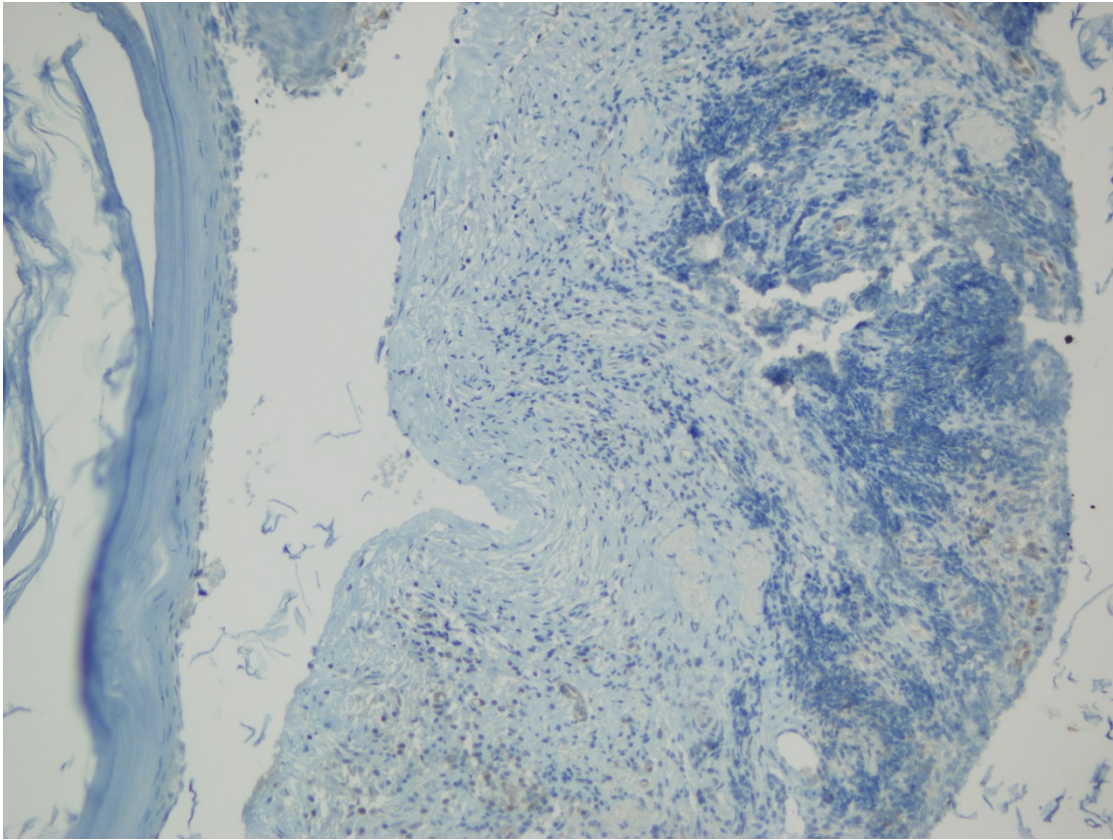
Resim-3 X20 büyütmeye %9 Ki-67



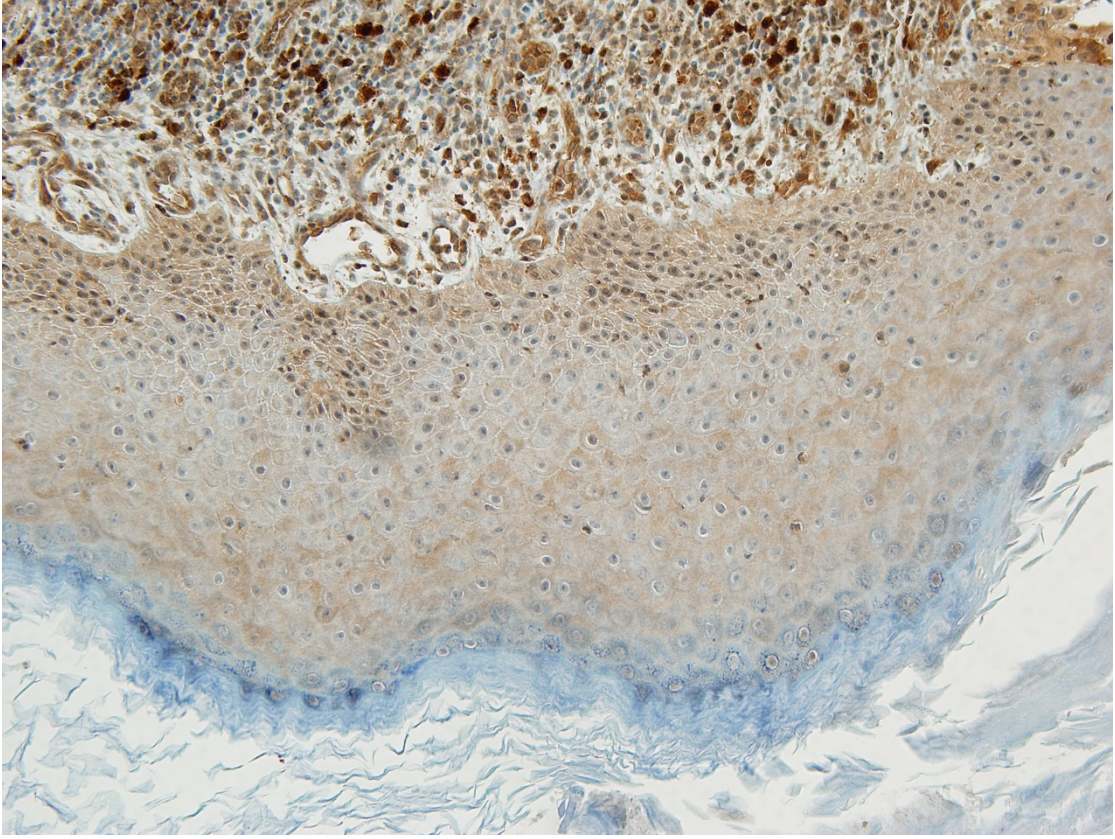
Resim-4 X10 büyütmeye %54 Ki-67



Resim-5 X10 büyütmede mikrodamar yapıları



Resim-6 X20 büyütmede kaspaz-3 boyanmamış (negatif)



Resim-7 X20 büyütmelerde yoğun kaspaz-3 boyanmış (pozitif)

6. BULGULAR

6.1. Genel özellikler

Çalışmaya 25 pediatrik ve 36 erişkin toplam 61 hasta dahil edildi. Hastaların 29'u (%47,5) kadın ve 32'si (%52,5) erkekti. Yaşları 3 ile 71 arasında değişen hastaların yaş ortalamaları 27.31 olarak saptandı [ortalama 27,31 (SS +/-18.345), ortanca 23 (3-71)]. Takip süreleri ortalama 27.2 [ortanca 22 (6-96)] ay idi. Pediatrik grupta takip süresi ortalama 30.4 ay [ortanca 25 ay (6-96 ay)] ve erişkin grupta 25,03 ay [ortanca 21ay (6-72 ay)] olarak saptandı (p:0,318). Hastaların 46'sında (%75) AAH ve 15'inde (%25) TTH gözlendi. Toplam 22 (%36) hastada ADKM ve 39 (%64) hastada ADİM uygulandı. Hastaların %27,86'sının (17/61) takiplerinde nüks kolesteatom gelişti. Hastaların genel özellikleri Tablo-4'de verildi.

Tablo-4 Hastaların Genel Özellikleri

	Toplam
Hasta Sayısı	61
Cinsiyet	
Erkek	32 (%52,5)
Kadın	29 (%47,5)
Yaş	
Ortalama (+/- SS)	27,31 (SS +/-18.345)
Ortanca (min - mak)	23 (min 3 - mak 71)
Yaş Grubu	
Pediatrik	25 (%41)
Erişkin	36 (%59)
Hastalık	
AAH	46 (%75)
TTH	15 (%25)
Cerrahi	
ADKM	22 (%36)
ADİM	39 (%64)
Ortalama Takip Süresi	
Min-Mak	6-96 Ay
Ortalama	27,2 Ay
Takipte Nüks	
Var	17 (%27,86)
Yok	44 (%72,14)

6.2. Klinik ve biyolojik değerlendirme

6.2.1. Kemikçik defektleri

6.2.1.1. Malleus - İnkus – Stapes

6.2.1.1.1. Malleus

Malleusta gelişen kemik defektleri incelendiğinde 15 hastada kısmi ve 10 hastada tam erozyon olmak üzere toplam 25 hastada malleus defekti saptandı. Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında pediatrik grubun % 32'sinde (7 hastada kısmi kemik erozyonu ve 1 hastada tam kemik erozyonu) ve erişkin grubun % 47,2'sinde (8 hastada kısmi kemik erozyonu ve 9 hastada tam kemik erozyonu) malleus defekti gözlemlendi. Orta kulak kemikçikleri içerisinde en az defekt malleusta izlendi ve erişkin grupta malleus defektleri pediatrik gruba kıyasla daha sık ve daha ileri düzeyde saptandı.

6.2.1.1.2. İnkus

İnkusta gelişen kemik defektleri malleus ve stapes defektlerinden daha fazla gözlemlendi. Çalışmada 26 hastada kısmi ve 29 hastada tam inkus defekti saptandı. Pediatrik hastaların % 92'sinde ve erişkin hastaların % 88,9'unda inkus defekti izlendi. Pediatrik hastalar içerisinde 16 hastanın (% 64) kısmi ve 7 (% 28) hastanın tam inkus erozyonu mevcuttu. Erişkin hastalar içerisinde ise 10 hastanın (% 27,8) kısmi ve 22 (% 61,1) hastanın tam inkus erozyonu mevcuttu. İnkus defekti pediatrik hastalarda daha sık olmasına karşın erişkin hastalarda defekt daha ileri düzeyde saptandı.

6.2.1.1.3. Stapes

Stapesin sadece kaputuna sınırlı kısmi kemik defektleri 30 hastada izlenirken caput ve krusların tamamen erode olduğu tam erozyon ise sadece 2 hastada saptandı. Pediatrik hastaların % 52'sinde ve erişkin hastaların % 52,8'inde stapes defekti izlendi. Pediatrik hastalar içerisinde tam erozyon gözlenmezken erişkin

hastaların 2'sinde tam erozyon gözlendi. Stapes defekti her iki grup arasında benzer olarak saptandı.

Orta kulak kemikçiklerinde saptanan defekleri içeren bilgiler Tablo-5'de verildi.

6.2.1.2. Fasiyal kanal

Dördü pediatrik grupta ve 10'u erişkin grupta olmak üzere toplam 14 hastada fasiyal kanalda dehissansı izlendi. Pediatrik grupta fasiyal kanal dehissansı % 16, erişkin grupta ise % 27,8 oranında saptandı.

6.2.1.3. LSSK

Dördü pediatrik ve 7'si erişkin grupta toplam 11 hastada LSSK'da dehissans izlendi. Pediatrik grupta LSSK dehissansı % 16, erişkin grupta ise % 19,4 oranında saptandı.

6.2.1.4. Tegmen

Biri pediatrik ve 3'ü erişkin grupta toplam 4 hastada tegmen defekti izlendi. Pediatrik grupta tegmen defekti % 4 ve erişkin grupta % 8,3 oranında saptandı.

Hastaların fasiyal kanal, LSSK ve tegmen defeklerini içeren bilgiler Tablo-5'de verildi.

Tablo-5 Kemik defektlerinin yerleşimi

	Malleus		İnkus		Stapes		Fasiyal Kanal	LSSK	Tegmen
	Kısmi erozyon	Tam erozyon	Kısmi erozyon	Tam erozyon	Kısmi erozyon	Tam erozyon			
Pediatrik	7	1	16	7	13	0	4	4	1
Erişkin	8	10	10	22	17	2	10	7	3
Toplam	15	11	26	29	30	2	14	11	4

6.2.2. Klinik verilerin değerlendirilmesi

6.2.2.1. Pediatrik hasta grubu

Pediatrik hasta grubunda 25 (13 kız ve 12 erkek) hasta mevcuttu ve yaş ortalaması 10,6 [ortalama 10,6 (SS +/-4.103), ortanca 10 (3-17)] idi. Hastaların 5'inde (%20) TTH, kalan 20 (%80) hastada ise AAH gözlemlendi. Pediatrik hastaların 11'inde (%44) ADKM ve 14'ünde (%56) ADİM uygulandığı görüldü. Onbir hastada (%44) nüks kolesteatom saptandı. OKRİ ortalaması 5,24 (SS +/- 2,026), AK ortalaması 1,56 (SS +/- 0,768), KS ortalaması 2,8 (SS +/- 2,198) olarak hesaplandı. Epitel kalınlığı ortalama 48,76 [SS +/- 20,757 ve ortanca 48 (15-92)] mikronmetre ölçüldü. Kİ-67 skoru ortalamala %20,44 [SS +/- 9,319 ve ortanca 18 (8-41)] ve mikrodamar sayısı ortalama 8,8 [SS +/- 4,61 ve ortanca 8 (3-15)] saptandı. Kaspaz-3 boyamalarında 12 hastada (%48) pozitif boyanma gözlenirken 13 hastada (%52) negatif boyanma gözlemlendi.

6.2.2.2. Erişkin hasta grubu

Erişkin hasta grubunda 36 (16 kadın ve 20 erkek) hasta mevcuttu ve yaş ortalaması 38,92 [ortalama 10,6 (SS +/-15.08), ortanca 36,5 (19-71)]saptandı. Hastaların 10'unda (%27,77) TTH, kalan 26 (%72,33) hastada ise AAH gözlemlendi. Erişkin hastaların 11'inde (%31) arka duvar korundu ve 6 (%16,66) hastada nüks kolesteatom gelişti. OKRİ ortalaması 5,89 (SS +/- 2,201) , AK ortalaması 2,14 (SS +/- 1,313) , KS ortalaması 3,92 (SS +/- 2,771) saptandı. Epitel kalınlığı ortalama 80,91 [SS:52,411 ve ortanca 72,5 (22-270)] mikronmetre ölçüldü. Kİ-67 skoru ortalamala %29,13 [SS:12,199 ve ortanca 27 (10-53)] ve mikrodamar sayısı ortalama 6,61 [SS:3,659 ve ortanca 6 (2-14)] saptandı. Kaspaz-3 boyamalarında 10 hastada (%27,8) pozitif boyanma gözlenirken 26 hastada (%72,2) negatif boyanma gözlemlendi.

6.2.2.3. Hastalık tipi

Hastalar mevcut orta kulak hastalıklarının AAH ya da TTH oluşlarına göre 2 gruba ayrılarak incelendi. Hastaların 46'sında (%75,4) AAH, 15'inde (%24,6) ise TTH saptandı. AAH olan 46 hastanın 12'sinde (%26,1) ve TTH olan 15 hastanın 5'inde (%33,3) nüks kolesteatom gözlemlendi. Hastalık tipi ve nüks oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Bulgular Tablo-6'da verildi. Pediatrik grup içerisinde 20 hastada AAH ve 5 hastada TTH, erişkin grupta 26 hastada AAH ve 10

hastada TTH mevcuttu. Hastalık tipi ile yaş grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ve bulgular Tablo-7'de verildi. Yaş gözetmeksizin hastalık tipine göre klinik ve patolojik veriler karşılaştırıldıklarında sadece OKRİ ve AK'da TTH'ı var olan grupta istatistiksel olarak anlamlı yükseklik saptandı. Hastalık tipi ile klinik ve patolojik bulguları karşılaştıran diğer verilerde anlamlı fark bulunmadı ve bulgular Tablo-8'de verildi.

Tablo-6 Hastalık tipi ve nüksleri içeren Fisher'in kesin ki-kare testi

	Nüks		Toplam
	Var	Yok	
AAH	12	34	46
TTH	5	10	15
Toplam	17	44	61

p: 0,741

Tablo-7 Hastalık tipi ve hasta yaşlarını içeren Fisher'in kesin ki-kare testi

	Yaş		Toplam
	Pediyatrik	Erişkin	
AAH	20	26	46
TTH	5	10	15
Toplam	25	36	61

p: 0,557

Tablo-8 Hastalık tipi ile klinik ve patolojik verilerin oranları

	OKRİ skoru	AK skoru	KS	Epitel Kalınlığı	%Ki67	Mikrodamar sayısı (CD31)	Kaspaz	Nüks
AAH n:46	5,09	1,74	3,28	62,38 (15-270)	25,45 (8-48)	7,11 (2-15)	15 %32,6 pozitif boyanma	12 %26,1
TTH n:15	7,27	2,40	4	79,20 (25-187)	24,93 (10-53)	8,73 (2-14)	7 %46,7 pozitif boyanma	5 %33,3
	*p: 0,001	*p: 0,03	*p: 0,286	*p: 0,123	*p: 0,717	*p: 0,206	**p: 0,325	***p: 0,741

* Mann whitney u testi , ** Pearson'un ki-kare testi, *** Fisher'in kesin ki-kare testi

6.2.2.4. Ameliyat tekniği

Hastaların 22'sinde (%36) ADKM ve 39'unda (%64) ADİM uygulandı. Arka duvarın korunduğu 22 hastanın 7'sinde (%31,8) ve arka duvarın indirildiği 39 hastanın 10'unda (%25,6) nüks kolesteatom gelişti (p: 0,605). Ameliyat tekniği ve

nüks oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ve bulgular Tablo-9'da verildi. 25 pediatrik hastanın 11'inde (%44) ve 36 erişkin hastanın yine 11'inde (%30,6) arka duvar korundu. Ameliyat tekniği ve yaş gruplarının dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ve bulgular Tablo-10'da verildi. Yaş gözetmeksizin ameliyat tekniğine göre klinik ve patolojik veriler karşılaştırıldıklarında sadece AK ve KS'nin arka duvarın indirildiği grupta anlamlı şekilde yüksek saptandığı gözlemlendi. Bu sonuç yaygın kolesteatomu bulunan hastalarda açık kavite tekniklerin tercih edilmesine bağlandı. Ameliyat tekniği ile klinik ve patolojik bulguları karşılaştıran diğer verilerde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ve bulgular Tablo-11'de verildi.

Tablo-9 Cerrahi tipi ve nüksleri içeren Pearson'un ki-kare testi

	Nüks		Toplam
	Var	Yok	
ADKM	7	15	22
ADİM	10	29	39
Toplam	17	44	61

p: 0,605

Tablo-10 Cerrahi tipi ve hasta yaşlarını içeren Pearson'un ki-kare testi

	Yaş		Toplam
	Pediatric	Erişkin	
ADKM	11	11	22
ADİM	14	25	39
Toplam	25	36	61

p: 0,282

Tablo-11 Cerrahi tipi ile klinik ve patolojik verilerin oranları

	OKRİ skoru	AK skoru	KS	Epitel Kalınlığı	%Ki67	Mikrodamar sayısı (CD31)	Kaspaz	Nüks
ADKM n:22	5,05	1,41	1,86	68 (25-142)	26,15 (8-53)	7,05 (2-14)	7 %31,8 pozitif boyanma	7 %31,8
ADİM n:39	5,95	2,18	4,36	66,16 (15-270)	24,86 (9-50)	7,77 (2-15)	15 %38,5 pozitif boyanma	10 %25,6
	*p: 0,139	*p: 0,011	*p:0,001	*p: 0,316	*p: 0,719	*p: 0,393	**p: 0,604	**p: 0,605

* Mann whitney u testi , ** Pearson'un ki-kare testi

6.2.3. Grupların karşılaştırması

Pediyatrik ve erişkin grup karşılaştırıldığında nüks oranları pediyatrik grupta artmış saptandı (p:0,019). Yaş grupları ile nüks oranlarını içeren bulgular Tablo-12'de verildi. OKRİ, AK ve KS erişkin grupta artmış saptanmasına karşın fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (sırasıyla p:0,28, p:0,07 ve p:0,118). Histopatolojik veriler incelendiğinde epitel kalınlığı ve Ki-67 erişkin grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış saptandı (sırasıyla p:0,009 ve p:0,01). CD-31 ile boyanan mikrodamar sayısı ise pediyatrik hasta grubunda istatistiksel olarak artmış olarak gözlemlendi (p:0,037). Kaspaz-3 sonuçları incelendiğinde pediyatrik grupta artmış olarak izlenmesine karşın aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,106). Erişkin ve pediyatrik hasta gruplarının klinik ve histopatolojik verilerini içeren bulgular Tablo-13'de verildi.

Tablo-12 Hasta yaşları ve nüksleri içeren Pearson'un ki-kare testi

	Nüks		Toplam
	Var	Yok	
Pediyatrik	11	14	25
Erişkin	6	30	36
Toplam	17	44	61

p: 0,019

Tablo-13 Hasta yaşları ile klinik ve histopatolojik verileri

	OKRİ skoru	AK skoru	KS	Epitel Kalınlığı	%Ki67	Mikrodamar sayısı (CD31)	Kaspaz	Nüks
P n: 25	5,24	1,56	2,8	48,76 (15-92)	20,44 (8-41)	8,8 (3-15)	12 %48 pozitif boyanma	11 %44
E n:36	5,89	2,14	3,92	80,91 (22-270)	29,13 (10-53)	6,61 (2-14)	10 %27,8 pozitif boyanma	6 %16,7
	*p:0,28	*p:0,07	*p:0,118	*p:0,009	*p:0,01	*p:0,037	**p: 0.106	**p: 0,019

* Mann whitney u testi , ** Pearson'un ki-kare testi

Yaş gözetmeksizin takipte nüks gelişen hastalar, nüks gelişmeyen hastalar ile karşılaştırıldıklarında OKRİ, AK, KS arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla p:0,139, p:0,987, p:0.795). Histopatolojik bulgular karşılaştırıldığında epitel kalınlığı ve Ki-67 nüks gözlenmeyen grupta artmış

izlenmesine karşın sadece Ki-67'de istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırasıyla p:0,48 ve p:0,012). CD-31 ile boyanan mikrodamar sayısı heriki grupta benzer oranlarda bulundu (p:0,961). Kaspaz-3 skoru ise nüks izlenen grupta artmış olmasına karşın fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,266). Nüks gelişen ve gelişmeyen grupların klinik ve histopatolojik verilerini içeren bulgular Tablo-14'de verildi.

Tablo-14 Nüks varlığı ile klinik ve patolojik verilerin oranları

	OKRİ skoru	AK skoru	KS	Epitel Kalınlığı	%Ki67	Mikrodamar sayısı (CD31)	Kaspaz
Nüks + n: 17	6,24	1,88	3,29	56,71 (18-116)	19,18 (8-41)	7,53 (2-15)	8 %47 pozitif boyanma
Nüks - n: 44	5,39	1,91	3,52	71,10 (15-270)	27,93 (9-53)	7,50 (2-14)	14 %32 pozitif boyanma
	*p: 0,139	*p: 0,987	*p: 0,795	*p: 0,480	*p: 0,012	*p: 0,961	**p:0,266

* Mann whitney u testi , ** Pearson'un ki-kare testi

6.2.4. Korelasyon analizleri

Tüm hastaların verileri dahil edilerek yapılan korelasyon analizlerinde OKRİ, AK ve KS arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon saptandı. Klinik skorların korelasyon sonuçları Tablo-15'de verildi.

Tablo-15 Klinik skorların korelasyonunda Kendall'in iki değişkenli korelasyon analizi

		OKRİ	AK	KS
OKRİ	Korelasyon katsayısı	1,000	0,685	0,453
	p	.	*0,001	*0,001
	n	61	61	61
AK	Korelasyon katsayısı	0,685	1,000	0,664
	p	*0,001	.	*0,001
	n	61	61	61
KS	Korelasyon katsayısı	0,453	0,664	1,000
	p	*0,001	*0,001	.
	n	61	61	61

Patolojik skorlar üzerinde yapılan korelasyon analizlerinde ise sadece epitel kalınlığı ve Ki-67 arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon saptandı. Diğer

parametrelerde anlamlı fark elde edilmedi. Patolojik skorların korelasyon sonuçları Tablo-16’da verildi.

Tablo-16 Klinik ve patolojik skorların korelasyonunda Kendall’ın iki değişkenli korelasyon analizi

		Epitel kalınlığı	Ki-67	Mikrodamar sayısı
Epitel kalınlığı	Korelasyon katsayısı	1,000	0,327	0,059
	p	.	*0,001	*0,532
	n	61	61	61
Ki-67	Korelasyon katsayısı	0,327	1,000	0,054
	p	*0,001	.	*0,574
	n	61	61	61
Mikrodamar sayısı	Korelasyon katsayısı	0,059	0,054	1,000
	p	*0,532	*0,574	.
	n	61	61	61

Klinik ve patolojik skorlar arasında yapılan korelasyon analizlerinin hiçbirinde parametreler arasında anlamlı korelasyon elde edilmedi. Klinik ve patolojik skorların korelasyon sonuçları Tablo-17’de verildi.

Tablo-17 Patolojik skorların korelasyon analizinde Kendall’ın iki değişkenli korelasyon analizi

		OKRI	AK	KS
Epitel kalınlığı	Korelasyon katsayısı	0,173	0,095	-0,004
	p	*0,072	*0,350	*0,967
	n	61	61	61
Ki-67	Korelasyon katsayısı	-0,038	-0,014	0,020
	p	*0,696	*0,890	*0,834
	n	61	61	61
Mikrodamar sayısı	Korelasyon katsayısı	0,021	-0,018	0,067
	p	*0,829	*0,859	*0,486
	n	61	61	61

7. TARTIŞMA

Kolesteatom, temporal kemiğin havalı boşlukları içerisinde gelişen skuamoz hücreli epitelden oluşmaktadır. Epitel tabakası periferde kolesteatom matriksini oluşturur ve merkezinde artmış keratin üretimine bağlı aselüler tabaka yer almaktadır ⁽⁷⁾. Matriksin çevresinde ise enflamatuar hücrelerden zengin perimatriks tabakası gözlenir. Perimatrikste gelişen enflamasyon ve enzimatik reaksiyonlar kolesteatomun kemik erozyonundan sorumlu tutulmaktadır ⁽⁷⁾.

Akkiz kolesteatomun gelişim süreci incelendiğinde farklı teoriler üzerinde durulsa da günümüzde AAH varlığında invaginasyon ve TTH varlığında ise migrasyon teorileri kabul edilmektedir. İnvaginasyon teorisinde retraksiyon cebinde bulunan epitel hücrelerinin orta kulağa ilerlediği görülür ve AAH'de kolesteatomun gelişiminden sorumlu mekanizmadır ^(20, 21). Migrasyon teorisinde ise pars tensada bulunan özellikle marjinal perforasyonlarda, perforasyon kenarından dış kulak yolu epitel hücreleri yine orta kulağa ilerler ve TTH'de kolesteatom gelişimi bu şekilde gözlenir ^(21, 22). AAH'nin kolesteatoma ilerleme riski TTH'ye oranla daha fazladır. Bu çalışmada 61 hastanın 46'sinde AAH ve 15'inde TTH gözlemlendi. Heriki hastalık nüks açısından değerlendirildiğinde hastalık tipi ile nüks gelişimi arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmadı. AAH'da nüks gelişme sıklığı %26,1 iken TTH'da %33,3 saptandı. Hastalık tipinin yaş grupları arasında dağılımı incelendiğinde pediatrik hastaların %80'inde ve erişkin hastaların ise %72,2'sinde AAH bulundu. AAH ile TTH bulunan hastaların klinik ve patolojik skorlarında, TTH bulunan grupta OKRİ ve AK skorları istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı. Bu farkın nedeni ise TTH bulunan hastalarda orta kulak mukozasının daha çok etkilenmesi ve tekrarlayan otorelere sebep olmasıdır. Bu da OKRİ skorunu arttırmaktadır. TTH grubunda KS daha fazla saptanmasına karşın bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. Histopatolojik verilerde ise gruplar arasında fark gözlenmedi.

Gelişim şekli nasıl olursa olsun patolojinin temelinde orta kulağa ilerlemiş epitel dokusu, artmış keratin üretimi ve çevre dokuda oluşturduğu enflamasyon yer almaktadır. Epitel dokusu normal şartlar altında orta kulak mukozası ile temas ettiğinde migrasyonun durması beklenir fakat kolesteatomda bu kontakt inhibisyon bozulmuştur ve epitel orta kulağa ilerler ⁽²³⁾. Bu mekanizmanın neden ve nasıl

bozulduğu halen aydınlatılabilmiş değildir. Enflamasyona bağlı artan büyüme hormonları ve sitokin düzeyleri epitel proliferasyonunu artırır ^(24, 25). Orta kulak ve mastoid içerisinde proliferen olan epitel dokusundan kontrolsüz şekilde keratin üretimi gelişir ve biriken debris enflamasyonu daha da artırır. Bu nedenle kolesteatomlu kronik otitte tek etkili tedavi seçeneği orta kulak ve mastoid kemik içerisindeki epitelin ve keratin debrisin temizlenmesi yani cerrahidir.

Cerrahinin amacı hastalığı tamamen temizlemek, kuru havalanan bir orta kulak sağlamak ve işitmeyi korumak ya da yeniden restore etmektir. Farklı teknikler tanımlanmasına karşın cerrahide en önemli değişken dış kulak yolu arka duvarının korunması ya da indirilmesidir. Her iki prosedürün birbirine bazı konularda üstünlükleri bulunmaktadır. Arka duvarın korunduğu hastalarda iyileşme hızlı ve işitme eşikleri daha yüksektir. Ayrıca kulak koruması gerekmez ⁽²⁶⁾. Komplikasyon gelişmiş kolesteatomlu kronik otitis media, pnömotizasyonu kötü sklerotik mastoid, tek işiten kulak ve nüks olgularda ise arka duvarın indirilmesi gerekmektedir ⁽²⁷⁾. Arka duvarın indirilmesi ile fasiyal reses, sinüs timpani ve epitimpanumun görüşü artırılır ve bu bölgelerde kalabilecek rezidü kolesteatom dokusunun daha güvenli şekilde çıkarılabilir. Bu nedenle arka duvarın indirildiği bir çok çalışmada nüks oranları daha düşük saptanmıştır ^(28,29).

Bu çalışmada arka duvarın korunduğu ve indirildiği hastalarda nüks gelişimi açısından fark saptanmadı. Bu iki grup arasında klinik skorlar incelendiğinde ise AK ve KS arka duvarın indirildiği hastalarda, arka duvarın korunduğu hastalara oranla anlamlı şekilde yüksek bulundu. Bu fark kolesteatomun daha yaygın seyrettiği hastalarda ADİM yapılmış olmasına bağlandı. İki grup arasında OKRİ ve histopatolojik veriler incelendiğinde ise istatistiksel olarak fark saptanmadı.

Kolesteatomda hastalığın biyolojik aktivitesinin nüks oranlarını etkileyebileceği ve biyolojik aktivitenin artmış olduğu hastalarda kolesteatomun daha agresif seyredebileceği düşünülmüştür. Epitelin hiperproliferatif süreci, kontrolsüz keratin üretimi ve perimatriksin enflamatuar özelliği kemik erozyonu ve dolayısıyla komplikasyon oranlarını arttırdığı varsayılabilir. Pediatrik hastalarda da kolesteatom nüksünün yüksek olduğu bilinmektedir fakat komplikasyon oranlarında erişkin hastalara oranla belirgin bir fark saptanmamıştır ^(4, 6, 30, 31). Bu özellikleri ile pediatrik

kolesteatomun patofizyolojisi ve histomorfolojisi bir çok çalışmada incelenmiş ve sıklıkla hiperproliferatif özelliği ve artmış enflamatuvar yanıt üzerinde durulmuştur.

Pediyatrik kolesteatom, agresif seyri ve nüks oranlarının fazla olması nedeniyle bir çok araştırmacının dikkatini çekmiştir. Özellikle 1980'li yılların sonlarında pediyatrik kolesteatomu konu alan birçok çalışma yayınlanmıştır. Elektron mikroskopisi kullanıma girdikten sonra Lim ve Saunders kolesteatomun histomorfolojik yapısını tanımlamışlardır ⁽⁷⁾. Epitel hücreleri matriksi oluştururken matriksin çevresinde yer alan enflamatuvar hücrelerden zengin granülasyon dokusunun oluşturduğu yapı ise perimatriks olarak adlandırılır. Lim ve Saunders'ın çalışmasından sonra pediyatrik kolesteatom histomorfolojisi üzerine yapılmış çalışmalar artmıştır.

Qaranta ve ark. pediyatrik kolesteatomun klinik özelliklerinden perimatriksteki enflamasyonu sorumlu tutmuşlardır. Otuz pediyatrik ve 30 erişkin hastanın kolesteatom dokularında perimatriksin histomorfolojik özelliklerini incelemişler ve pediyatrik grupta perimatrikste mononükleer hücrelerin sayıca fazla olduğunu saptamışlardır ⁽³²⁾. Bu bulgular ile pediyatrik kolesteatomda perimatriksin daha kalın ve aktif olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Mayot ve ark. kolesteatomlu otit nedeniyle cerrahi uygulanan 14 pediyatrik hastanın doku örneklerini incelemişler ve epidermis ile orta kulak mukozasının karşılaştığı bileşkede şiddetli bir enflamatuvar yanıt gözlemişlerdir ⁽³³⁾. Mukozada CD1+ Langerhans hücreleri, mast hücreleri ve IgA üreten hücreleri saptayarak gecikmiş tip hipersensitivite ile uyumlu bulgular elde etmişler ve kolesteatom patogeneğinde mukozada gelişen bu enflamasyonun sorumlu olabileceğini düşünmüşlerdir.

Dornelles ve ark. ise pediyatrik ve erişkin hastalarda enflamatuvar reaksiyonların merkezi olan perimatriks kalınlığını ölçmüşler ve 27 ile 1277 mikrometre arasında değişen sonuçlar elde etmişlerdir ⁽³⁴⁾. Erişkin hasta grubunda perimatriks kalınlığının ortalaması daha fazla olmasına karşın korelasyon analizlerinde yaş ile perimatriks kalınlığı arasında ılımlı fakat ters yönde korelasyon saptamışlardır. Kısacası Dornellesin çalışmasının sonucunda hasta yaşı arttıkça perimatriks kalınlığı azalmaktadır.

Perimatrikste gelişen enflamasyonun şiddeti sitokin düzeylerini artırır ve epitelde proliferatif süreci tetikler. Kolesteatomda epitel dokuda artan proliferasyon ve

diferansiyasyon ile keratin üretimi de artar. Protein yapıda hücre içi flamenler olan sitokeratinler sitoplazmada suprabazal tabakalarda birikir ve matriksin en periferinde aselüler keratin tabakalarını oluşturur ⁽³⁵⁾. Özellikle SK-10 ve SK-14 kolesteatom dokusunda diferansiyasyonla birlikte artan keratin tipleridir. Matrikste biriken bu keratine karşı gelişen enflamatuar yanıt yine kolesteatomun patogenezinin sorumludur ⁽³⁵⁾. Epitelin artmış proliferasyonun görüldüğü diğer dermatolojik hastalıklarda olduğu gibi SK-16 da kolesteatom dokusunda artmış saptanmıştır ⁽³⁴⁾.

Pediyatrik kolesteatomda proliferasyon üzerine yapılan bir diğer çalışmada Welkoborsky ve ark. epitelin proliferatif özelliği için Ki-67 düzeylerini ve hücreler arası etkileşim için alfa1beta6-integrin, E-cadherin, I-CAM=CD54, alfa ve beta3 integrin , V-CAM=CD106, CD44v6 ve fibronektin düzeylerini karşılaştırmışlardır ⁽³⁶⁾. Çalışmada Ki-67 skorlarını pediyatrik hastalarda erişkin hastalara oranla yüksek bulmalarına karşın diğer parametrelerde fark saptamamışlardır.

Perimatriksin boyutsal özellikleri dışında belki de daha önemlisi metabolik aktivitesidir. Dornelles ve ark. epitel kalınlığı, perimatriks kalınlığı ve perimatrikste enflamatuar hücre yoğunluğu üzerine pediyatrik ve erişkin hastalardan oluşan popülasyonda yaptıkları çalışmada matriks ve perimatriks kalınlığı arasında kuvvetli korelasyon saptamışlardır ⁽³⁷⁾. Fakat perimatriksteki enflamatuar hücre yoğunluğu ile ne hasta yaşı ne de perimatriks kalınlığı arasında korelasyon bulamamışlardır.

Perimatrikste gelişen enflamasyonun şiddetinin değerlendirilmesi için Dornelles ve ark. yine pediyatrik ve erişkin kolesteatom dokularından oluşan kesitlerde anjiyogenez için CD-31 ve metalloproteinaz (MP) aktivitesi için MP-2 ve MP-9 düzeylerini incelemişlerdir. Pediyatrik grupta CD-31 ve MP düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptamışlardır ⁽¹¹⁾.

Kolesteatomda gelişen epitel proliferasyonu enflamasyon dışında büyüme faktörlerinden de etkilenmektedir. Özellikle epidermal büyüme faktörünün kolesteatom patogenezindeki rolü bir çok çalışmada gösterilmiştir ^(38,39). Alves ve ark. pediyatrik ve erişkin hastaları içeren bir grupta yaptıkları çalışmada epidermal büyüme faktörü reseptörünü sadece bazal tabakada değil suprabazal tabakalarda da artmış saptamışlardır. Fakat epidermal büyüme faktörü reseptörü ekspresyonu ile hasta yaşı arasında bir ilişki bulamamışlardır ⁽⁴⁰⁾.

Proliferatif sürecin aydınlatılmasına yönelik son yıllarda ise yapılan mRNA ve DNA çalışmaları dikkat çekmektedir.

Tüm bu çalışmalar değerlendirildiğinde kolesteatomun patogenezi oldukça karışık süreçleri içermektedir. Matriks ve perimatrikste gelişen histopatolojik ve biyokimyasal olaylar sonuçta kemik erozyonu ile sonuçlanır. Mekanizmanın temel bileşenleri ise artmış epitel proliferasyonu ve enflamasyondur. Bu süreçler kliniğin farklı ilerlediği pediatrik ve erişkin hastalarda ise ayrı ayrı değerlendirilmelidir.

Literatür incelendiğinde pediatrik hasta grubunun farklı çalışmalarda farklı yaş gruplarını içerdiği görülmektedir. Sıklıkla 18 yaş ve altı hastalar bu gruba dahil edilse de kabul edilmiş bir sınır bulunmamaktadır. Ayrıca küçük çocukluk döneminde gelişmiş kolesteatomun genç erişkin hastalar ile aynı grupta değerlendirilmesi de tartışmaya açık bir konudur. Çalışmalarda 12, 14, 16 ve 18 yaşlarının üst sınır olarak alındığı görülmektedir.

Wetmore ve ark. 161 kolesteatomlu pediatrik hasta üzerinde yaptıkları incelemede insidansın zirve yaptığı yaş aralığını 6-10 olarak saptamışlardır ⁽⁴¹⁾. Pediatrik kolesteatom üzerine yapılmış bir diğer geniş seride ise yine benzer şekilde insidansın zirve yaptığı yaş ortalaması 10,7 bulunmuştur ⁽⁴²⁾. Bazı yazarlar küçük çocukluk döneminde saptanan kolesteatomların konjenital kolesteatomun progresyonu sonrası geliştiğini öne sürmekte olsa da bu kanıtlanabilmiş bir teori değildir.

Çalışmamızda pediatrik hasta grubu 18 yaş altı olarak belirlendi. Fakat pediatrik hasta grubu 12 yaş ve altı ile 12 yaş üstü olarak 2 gruba ayrılarak değerlendirildiğinde iki grup arasında OKRİ, AK, KS, epitel kalınlığı, Ki-67 ve mikrodamar sayısı açısından istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmadı. 9 hastadan oluşan 12 yaş ve altı grupta 5 nüks gelişirken 16 hastadan oluşan 12 yaş üstü grupta ise 6 nüks gelişti.

Çalışmamızda kolesteatom dokusunun histopatolojik özelliklerinin hastaların klinik özellikleri ile değerlendirilmesi amaçlandı. Klinik veriler OKRİ, AK ve KS ve histopatolojik veriler de epitel kalınlığı, Ki-67, CD-31 ve kaspaz-3 olarak belirlendi. Literatürde yer alan çalışmalar doğrultusunda epitel kalınlığı ve Ki-67 değerleri epitel proliferasyonu, CD-31 boyanan mikrodamar sayısı perimatriksteki enflamasyonu ve kaspaz-3 değerleri ise epitel apoptotik aktivitesini göstermektedir.

Kolesteatomun aktivitesini ve oluşturduğu kemik erozyonunu değerlendirmek için OKRİ, AK ve KS kullanıldı. OKRİ'nde hastanın operasyon öncesinde otoresi, zar perforasyonu, kolesteatom varlığı, orta kulak mukozası, kemikçikler, öncesinde cerrahi varlığı ve sigara içimi gibi değişkenler kullanılarak bir skor belirlenir. OKRİ ilk kez 1994 yılında Kartush tarafından oluşturulmuş ve 2001 yılında revize edilmiştir (18,19). Timpanoplasti prognozunu ve başarısını belirlemek için kullanılmaktadır.

Çalışmamızda OKRİ pediatrik hastalarda erişkin hastalara kıyasla daha düşük saptandı fakat fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. TTH bulunan grupta ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı. Bu hasta grubunda orta kulak mukozasının AAH'a oranla daha fazla etkilenmiş olması, granülasyon dokusu, hiperplastik mukoza ve tekrarlayan otore atakları oluşturarak OKRİ skorunu arttırabileceği düşünüldü. Korelasyon analizlerinde OKRİ ile AK ve KS arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon elde edildi. Bu korelasyon değerlendirildiğinde OKRİ skoru fazla olan hastalarda kemik erozyonunun fazla olabileceği düşünülebilir. OKRİ ile diğer patolojik skorlar arasında ise anlamlı korelasyon saptanmadı.

Austih-Kartush Sınıflaması ise ilk kez 1972 yılında Austin tarafından oluşturulmuş kemikçik defektlerini 4 gruba ayıran bir sınıflamadır (17). Malleus uzun kolu ve stapes suprastrüktürünün varlığı değerlendirilir. 1994 yılında Kartush tarafından stapes taban fiksasyonu ve kemikçiklerin attikte fiksasyonu sınıflamaya eklenerek revize edilmiştir (18). Osiküloplastide kullanılan bu sınıflama kemik erozyonunun durumuna dayalı bir sistem olsa da kolesteatomda gelişen kemik defektlerinin yaygınlığını belirlemek için değil asıl olarak işitme eşiklerini etkileyen temel anatomik noktaları içerir. AK sınıflaması hastaların klinik skorlarında bir değişken olarak çalışmaya alınmıştır. Çalışmamızda AK skoru osiküloplastide başarıya ya da işitme sonuçlarını karşılaştırmak için değil kolesteatomun oluşturduğu kemik erozyonunun bir göstergesi olarak çalışmaya dahil edildi.

Çalışmamızda AK TTH'ı bulunan ve ADİM uygulanan hasta gruplarında istatistiksel açıdan anlamlı şekilde yüksek bulundu. TTH bulunan hastalarda mezotimpanum tutulumu nedeniyle kemik defektlerinin fazla olması, AK skorunun bu grupta yüksek saptanmasını açıklayabilir. Fakat KS, AAH grubunda AK skoru kadar yüksek saptanmadı. Bu nedenle hastalık tipinin kemik erozyonu üzerinde belirgin etkisinin olmadığı söylenebilir. OKRİ skorunun TTH grubunda yüksek olması ise orta

kulak mukozasının TTH'da daha fazla etkilenmesi ve oluşturacağı akıntılı dönemler ile OKRİ skorunu arttırmış olabileceği düşünüldü. Erişkin ve pediatrik hastalar karşılaştırıldıklarında ise AK skoru erişkin grupta yüksek bulunmasına karşın fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı.

Korelasyon analizlerinde AK ile OKRİ ve KS arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon saptandı fakat bu bilgi değerlendirilirken AK skorunun OKRİ içerisinde yer alan bir parametre olduğu unutulmamalıdır. AK skorunun diğer patolojik veriler ile istatistiksel olarak anlamlı korelasyonu bulunmadı.

Çalışmamızda kemik erozyonunu incelemek için orta kulak kemikçikleri, fasyal kanal, LSSK ve tegmen defektlerini içeren bir skrolama sistemi kullanıldı. 'Kemik skoru' olarak isimlendirilen bu sistemde her bir kemikçik için kısmi erozyon 1 ve tam erozyonun 2 puan ile, fasyal kanal, LSSK ve tegmen defektlerinin kısmi erozyonunun gösterilememesi nedeniyle bu alanlarda saptanan defektler 2 puan ile skorlandı. Sonuç olarak her bir hasta için 0 ile 12 arasında değişen bir sonuç elde edildi. KS erişkin hasta grubunda yüksek saptanmasına rağmen fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. KS ile diğer parametreler arasında yapılan korelasyon analizlerinde ise pozitif yönde anlamlı korelasyon saptandı. Kemik skoru ile patolojik parametreler arasında ise korelasyon bulunmadı.

Daha önce yapılan birçok farklı çalışmada orta kulak kemikçikleri, fasyal kanal, LSSK ve tegmen defektleri kullanılmış fakat kemik erozyonunun ağırlığını gösterecek rakamsal bir veri oluşturulamamıştır ⁽⁴³⁻⁴⁶⁾.

Mallet ve ark. kemik erozyonunu göstermek için tek bir kemikçik erozyonu varsa hafif, birden çok kemikçik erozyonu varsa ya da tegmen, LSSK, fasyal kanal, sigmoid sinus duvarlarında kemik defekt var ise ağır kemik erozyonu olarak değerlendirmişlerdir ⁽⁴⁷⁾. Çalışmalarında kemik erozyonunu kolesteatomdaki proliferasyon ile karşılaştırmışlar ve proliferasyon markırı olarak Ki-67 kullanmışlardır. Sonuç olarak ağır kemik erozyonu bulunan grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde Ki-67 skorlarını yüksek saptamışlardır. Aynı çalışmada 17 yaş altı grubu 17 yaş üstü ile karşılaştırdıklarında pediatrik hastalarda Ki-67 skorlarını yüksek bulmalarına karşın bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Wang ve ark. 155 kolesteatomlu hasta üzerinde yaptıkları çalışmalarında kemik erozyonu için fasyal kanal, LSSK ve tegmen duvarlarını değerlendirmişlerdir ⁽⁴³⁾.

Çalışmada fasiyal kanal dehissansını % 29,7 , LSSK defektini % 5,2 ve tegmen defektini % 16,8 saptamışlardır.

Bu 3 kemik oluşumu değerlendiren bir diğer çalışma ise Özbek ve ark. tarafından 2009 yılında yapılmıştır ⁽⁴⁴⁾. Çalışmada toplam 265 kronik otitli hastayı incelediklerinde fasiyal kanal erozyonunu %21,1 sıklıkta gözlemişler (56 hasta) fakat kolesteatomlu kronik otitli 118 hastada ise fasiyal kanal erozyonunu %37,2 sıklıkta saptamışlardır. 68 hastadan oluşan pediatrik grupta fasiyal kanal erozyonunu 7 hastada (%10,3), 197 hastadan oluşan erişkin grupta 49 hastada izlemişlerdir (%24,9). Çalışmada 12 LSSK dehissansı saptamışlar (%4,5) ve bu hastaların 10'unda fasiyal kanal erozyonunun eşlik ettiğini tespit etmişlerdir. LSSK dehissansı pediatrik grupta %2,9 (2 hasta) ve erişkin grupta %4 (8 hasta) saptamışlardır. Aynı çalışmada 4 hastada tegmen defekti saptamışlar ve bu hastaların hepsinin kolesteatomlu kulak olduğunu ve aynı zamanda LSSK ile fasiyal kanal defektinin de eşlik ettiğini gözlemişlerdir.

Fasiyal kanal dehissansını inceleyen çalışmalarda ise defektin doğumsal mı ya da kronik otite mi bağlı olduğunu anlamak her zaman mümkün değildir. Histolojik ve anatomik çalışmalarda yapılan temporal kemik diseksiyonlarında Fallop kanal dehissansları %25-57 arasında değişen oranlarda saptanmıştır ⁽⁴⁸⁾. Bu oran klinik çalışmalarda daha düşüktür çünkü operasyon sırasında otomikroskop ile fasiyal kanal dehissanslarının saptanması daha zordur.

Li ve ark. 1996 yılında stapes cerrahisi uygulanmış 1465 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada fallop kanal dehissanslarının sıklığını %11,4 saptamışlardır ⁽⁴⁹⁾. Kolesteatomlu kulaklarda gözlenen fasiyal kanal dehissansı üzerine yapılmış çalışmalarda ise Selesnick ve ark. 67 kolesteatomlu kulakta %33, Lin ve ark. 117 kolesteatomlu kulakta %33,3, Moody ve ark. 416 kolesteatomlu kulakta %18,8 ve Magliulo ve ark. 336 kolesteatomlu kulak içerisinde 16 yaş altı grupta %7,8 ve erişkin grupta %29,5 saptamışlardır ^(46,50-52).

LSSK dehissansını inceleyen çalışmalarda Magliulo ve ark. 1205 kolesteatomlu kulak içerisine yaptıkları araştırmada 71 hastada LSSK'da ve 9 hastada otik kapsülün birden çok bölgesinde yerleşmiş fistüller izlemişlerdir ⁽⁵³⁾. Gersdorff ve ark. ise kronik otitis media nedeniyle cerrahi uygulanan grupta %7 sıklıkta labirent fistülü saptamışlar ve %61'inde fistülün LSSK yerleşimliği olduğunu izlemişlerdir ⁽⁵⁴⁾.

Çalışmamızda 61 hastanın %23'ünde (14 hasta) fasiyal kanal, %18'inde (11 hasta) LSSK ve %6,6'sında (4 hasta) tegmen defekti izlendi. Pediatrik hasta grubunda fasiyal kanal dehissansı % 16 (4 hasta), LSSK dehissansı % 16 (4 hasta) ve tegmen defekti % 4 (1 hasta) oranında saptandı. Erişkin grupta bu rakamlar sırasıyla % 27,8 , % 19,4 ve % 8,3 olarak elde edildi. Bu sonuçlar daha önce yapılmış benzer çalışmalar ile uyumlu olmakla birlikte erişkin hastalarda fasiyal kanal, LSSK ve tegmen defektleri daha fazladır. Bu durum kolesteatom varlığının zamanla çevre dokuda kemik erozyonu gelişimini artırmasının bir sonucu olabilir.

Kolesteatom patogenezinde en önemli mekanizmaların başında kontrolsüz hücre proliferasyonu gelir. Bazal membranın üzerinde bulunan epitelin en derin tabakası germinatif tabakayı oluşturur ve sürekli bölünen hücreler periferde doğru hücre göçü ile ilerler. Bu göç sırasında hücre sitoplazmasında sitokeratin birikimi gözlenir. En dış katmanda yani stratum korneumda tamamen aselüler bir keratin kümesi gelişir. Bazal tabakadan periferde doğru ilerleyen bu göç sırasında epitel diferansiyasyona ve proliferasyona uğrar. Eğer proliferasyon fazla ise epitel hücreleri olgunlaşmadan periferde ilerleyecek ve dolayısıyla selüler tabakanın genişliği artacaktır. Kolesteatomda kontrolsüz bir şekilde gelişen bu epitel proliferasyonu üzerine yapılmış çalışmalarda hücre mitozunu gösterebilmek için immünomarkır olarak Ki-67 kullanılmıştır.

Ki-67 hücre siklusunun G1, S, G2 ve M fazlarında saptanan proliferasyonun kuvvetli bir göstergesidir ^(9,38). Bujia ve ark. tarafından 1996 yılında yapılan bir çalışmada pediatrik hasta grubunda erişkin ve normal dış kulak yolu cildine kıyasla anlamlı olarak fazla saptanmış ve pediatrik kolesteatomun agresif seyrinden sorumlu olabileceği düşünülmüştür ⁽³⁸⁾.

Mallet ve ark. Ki-67 değerlerini, kemik destrüksiyonu ve yoğun inflamasyonu bulunan hastalarda anlamlı şekilde yüksek bulmuşlardır ⁽⁴⁷⁾. Fakat Welkoborsky ve ark. ise yine Ki-67 markırını kullanarak yaptıkları analizde osiküler zincir hasarı ile proliferasyonun ilişkili olmadığını gözlemişlerdir ⁽³⁷⁾.

Çalışmamızda pediatrik hastaların Ki-67 düzeyleri erişkin hastalara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük saptandı. Epitel kalınlığı değerlendirildiğinde benzer şekilde pediatrik grupta anlamlı olarak düşük bulundu. Bu sonuç pediatrik hastalarda epitelin hiperproliferatif özelliğinin erişkin gruba kıyasla daha düşük

olduğunu göstermektedir. Nüks gelişen ve gelişmeyen gruplar arasında değerlendirildiğinde ise nüks etmeyen grupta Ki-67 değerleri yüksek bulundu. Nüks etmeyen grupta erişkin hastaların fazla olması ve erişkin grupta nüks oranlarının düşük ve Ki-67 düzeylerinin yüksek bulunması bu ters ilişkiyi açıklayabilir. Korelasyon analizlerinde Ki-67 skoru patolojik verilerden sadece epitel kalınlığı ile korele saptandı. Klinik parametrelerin hiçbirinde Ki-67 ile korelasyon bulunmadı.

Kolesteatom epitelinde artan proliferasyon epitel hücrelerinin diferansiyasyonlarını tamamlamadan perifere ilerlemesine neden olur ve bu şekilde epitel kalınlığı artar. Çalışmamızda epitel kalınlığı ile Ki-67 skorlarının korele bulunması bunu desteklemektedir. Epitel kalınlığı da Ki-67'ye benzer şekilde erişkin grupta anlamlı oranda artmış saptandı. Yine nüks gelişmeyen hasta grubunda artarken bu fark anlamlı bulunmadı. Korelasyon analizlerinde ise epitel kalınlığının Ki-67 dışında patolojik ya da klinik parametreler ile korelasyonu bulunmadı.

Kolesteatomda gelişen hipoksik sürecin inflamatuvar reaksiyonları artırdığı ve inflamatuvar hücrelerden salgılanan büyüme faktörlerinin angiogenezi tetiklediği üzerinde durulmuştur. Perimatrikste artan angiogenez üzerinde yapılan çalışmalarda Stammberger ve ark. faktör 8 seviyelerini incelemişler ve kolesteatomda normal cilde oranla artmış faktör 8 düzeylerine ulaşmışlardır ⁽⁵⁵⁾. Sudhoff ve ark. yaptıkları çalışmada kolesteatom dokusunda artmış angiogenezden sorumlu β -FGF, TGF (transforming growth factor)- α , TGF- β 1 ve VEGF gibi büyüme faktörlerini hem dış kulak yolu cildine hem de orta kulak mukozasına oranla artmış saptamışlardır ⁽⁵⁶⁾.

Tümör angiogenezi üzerine yapılmış çalışmalarda damar endotelinde bulunan bir immünomarkır olarak CD-31 tanımlanmıştır. Diğer angiogenez markırlarından farkı olarak lenfatik damarlarda bulunmamaktadır ^(10,11). Kolesteatom dokusunda özellikle perimatrikste artan enflamasyon ve angiogenez CD-31 değerleri ile gösterilebilir. Artan CD-31 bu nedenle kolesteatom aktivitesinin biyolojik markırlarından biri sayılmıştır ^(11,12).

Dornelles ve ark. 60 pediatrik ve 60 erişkin hastayı karşılaştırdıkları çalışmada pediatrik hasta grubunda CD-31 seviyesini perimatrikste anlamlı oranda yüksek saptamışlardır ⁽¹¹⁾. Aynı çalışmada metalloproteinazların da (sitoplazmik ve nükleer MMP2 , MMP9) yüksek saptanması gerekçesiyle CD-31'i enflamasyonun derecesi ile ilişkilendirmişlerdir.

Jin ve ark. epidermal büyüme faktörü reseptörü ve CD-31 düzeyleri üzerine yaptıkları çalışmada 32 kolesteatom dokusunu 6 postaurikular cild dokusu ile karşılaştırmışlardır ⁽¹²⁾. Epidermal büyüme faktörü reseptörünü kolesteatom dokusunda istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da yüksek saptamışlardır. CD-31 düzeylerini ise kolesteatom dokularında cilde oranla anlamlı olarak yüksek saptamışlar ve büyüme faktörü reseptörü seviyeleri ile korele izlemişlerdir ⁽¹²⁾.

Çalışmamızda ise CD-31 immünomarkırı ile boyanmış mikrodamar sayısı pediatrik hasta grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu. Nüks gelişen ve gelişmeyen gruplar arasında ise fark saptanmadı. Korelasyon analizlerinde mikrodamar sayısı ile hiçbir klinik ya da histopatolojik parametre arasında korelasyon bulunmadı.

Kolesteatom dokusunun hiperproliferatif özelliğini yansıtan bir diğer bulgu artmış apoptotik aktivitedir. Stratum bazalede başlayan ve aselüler keratin tabakasına kadar devam eden epitel göçü bazalde artmış hücre siklusu ve periferde artmış apoptoz ile karakterizedir ⁽¹³⁻¹⁵⁾. Apoptotik reaksiyonlarda sistein proteaz ailesinden kaspazlar sorumludur ve kaskadın aktivasyonu ile son basamakta apoptotik nükleazlar aktifleşir. Kaskadın ilk basamaklarında tümör nekroz faktörü alfa tarafından aktiveleştirilen kaspaz-8, kaspaz-3'ü ve son aşamada kaspaz-3 apoptotik nükleazları tetikler ⁽¹⁶⁾.

Huisman ve ark. kolesteatom spesmenlerinde kaspaz-3 seviyelerinde ılımlı bir yükseklik saptamışlardır ⁽⁵⁷⁾. Miyao ve ark. yaptıkları çalışmalarında kolesteatomda kaspaz-3 aktivitesini artmış saptanmışlardır. Artmış apoptozun sonucunda daha fazla keratin debrisin biriktiğini ve bu debrisin inflamasyonu arttırabileceğini düşünmüşlerdir ⁽¹⁶⁾.

Çalışmamızda pediatrik hastalarda kaspaz-3 pozitifliği erişkin hastalara oranla istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artmış bulundu. Nüks gelişen ve gelişmeyen gruplar arasında ise fark saptanmadı.

Çalışmanın kısıtlayıcı özellikleri genel olarak değerlendirildiğinde en önemli bulgu mastoidektomi uygulanan hasta sayısının fazla olmasına karşın incelenebilen doku örneklerinin çok daha az olmasıdır. Mastoidektomi uygulanan her hastadan histopatolojik inceleme için örnek alınmamış olması ya da alınan örneklerin tam kalınlıkta epitel dokusunu içermemesi bu durumun en büyük gerekçesidir. Tüm hastalardan ameliyat sırasında matriksi ve perimatriksi içeren doku örneklerinin

alınması ileride yapılabilecek çalışmalar için alt yapı oluşturulmasında çok önemlidir. Hatta alınan örneklerin formol dışında -80C derecede saklanması mRNA ve DNA çalışmalarına olanak sağlayacaktır. Sınırlayıcı başka bir faktör ise geriye dönük yapılan bu çalışmada hastaların dış kulak yollarından ya da postaurikular insizyonlarından cilt örneklerinin alınmamış olması ve histopatolojik verilerin normal cilt ile karşılaştırılamamasıdır. Ayrıca tüm ameliyatların aynı hekim tarafından yapılmamış olması, hekim tecrübesi ve uygulanan cerrahi tekniklerin nüks oranlarını etkileyebileceği göz önünde bulundurulduğunda yine çalışmayı sınırlandıran bir özellik olarak sayılabilir.

Sonuç olarak kolesteatom dokusu artmış proliferasyon ve enflamasyon özellikleri taşıyan ve bu özellikleri ile çevre dokuda kemik erozyonu oluşturan bir hastalıktır. Kolesteatomun aktivitesini yansıtan klinik ve biyolojik parametreler hastalığın patofizyolojisi ve prognozundaki değişkenleri belirleyebilir. Bu konuda yapılmış bir çok çalışmada pediatrik kolesteatomun erişkinlere kıyasla daha agresif seyirli olduğu, nüks ve komplikasyon oranlarının fazla olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda pediatrik hasta grubunda nüks oranlarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış olduğunu gördük. Fakat bu fark klinik ve patolojik skorlarda beklenen şekilde korele bulunmadı. Aksine tüm klinik skorlar erişkin hasta grubunda artmış saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da AK ve KS'nin erişkin grupta yüksek olması ve epitel kalınlığı ile Ki-67 gibi proliferasyon ile ilişkili parametrelerin anlamlı şekilde erişkin hastalarda yüksek çıkması, pediatrik kolesteatomların agresif seyrinden kolesteatomun biyolojik aktivitesinin sorumlu olmadığını göstermiştir.

Erişkin hastalarda kemik erozyonunun epitel kalınlığı ve Ki-67 gibi proliferasyon markırları ile birlikte artmış saptanması proliferatif sürecin kemik erozyonuna sebep olduğunu düşündürebilir fakat kemik skorları ile Ki-67 ve epitel kalınlığı arasında korelasyon bulunmaması bu ilişkiyi zayıflatmaktadır.

Pediatrik grupta ise sadece CD-31 ile boyanan mikrodamar sayısı perimatrikste yüksek saptandı ve mikrodamar sayısının artmış enflamatuar süreci temsil ettiği düşünülürse kemik erozyonunun bu grupta artırması beklenirdi fakat kemik erozyonu pediatrik grupta fazla olmadığı gibi CD-31 skorları da kemik skorları ile korele bulunmadı.

Tüm bu parametreler göz önünde bulundurulursa pediatrik hastalarda kolesteatomun biyolojik aktivitesinin erişkinden daha ağır olduğu düşünülemez. Kolesteatomda gelişen kemik erozyonunun ise proliferatif özellikler göz önünde bulundurularak daha ayrıntılı çalışmalarla incelenmesi gerekmektedir. Günümüzdeki bilgiler ışığında kemik erozyonunu kolesteatomun biyolojik özellikleri etkilese dahi en önemli parametre hastalığın süresidir ve bu nedenle erişkin hastalarda kemik destrüksiyonu artmıştır.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Pediyatrik kolesteatomda nüks oranları literatürdeki diğer çalışmalar gibi bu çalışmada da yüksek saptandı. Kolesteatomun proliferatif özelliğini yansıtan epitel kalınlığı ve Ki-67 gibi veriler ise erişkin hasta grubunda daha yüksek bulundu. Bu sonuçlar ile çalışmamız kolesteatomun agresif seyrini artmış proliferasyona bağlayan çalışmaları desteklememektedir.

Pediyatrik hasta grubunda CD-31 ile boyanmış mikrodamar sayılarının artmış bulunmasına karşın bu grupta kemik erozyonu erişkin hastalara oranla daha düşük izlendi. Bu nedenle artmış mikrodamar sayısı ile kemik erozyonunu arasında bir ilişki saptanmadı.

Korelasyon analizlerinin sonuçlarında ise klinik ve histopatolojik veriler arasında kuvvetli bir ilişki izlenmedi.

Sonuç olarak kolesteatomun klinik seyri histopatolojik ve histomorfolojik özelliklerinden çok hastalığın süresi ile ilişkili olabilir. Pediyatrik kolesteatomda nüks oranlarının yüksek olmasını kolesteatomun histopatolojik özellikleri ile açıklayabilecek bulgular elde edilmedi.

Patofizyolojik süreçlerin aydınlatılmasında daha önce alınmış doku örneklerinde yapılan çalışmalar ile önemli ilerlemeler sağlanmasına rağmen bu süreçlerin neden sonuç ilişkisini daha iyi ortaya koyabilmek için taze dondurulmuş dokular üzerinde yapılacak mRNA çalışmaları önemli yer tutacaktır.

9. KAYNAKLAR

1. Meyer TA, Strunk CL, Lampert PR. Cholesteatoma. In: Byron J Bailey and Jonas T Johnson Head and Neck Surgery – Otolaryngology, 4(2) edition, Lippincott, Philadelphia. 2006;2081-92.
2. Louw L. Acquired cholesteatoma: summary of the cascade of molecular events. J Laryngol Otol. 2013;127(6):542-9.
3. Ferlito O, Devaney KO, Rinaldo A, Milroy C, Wenig B, Iurato S. Clinicopathological consultation ear cholesteatoma versus cholesterol granuloma. Ann Otol Rhinol Laryngol 1997;106:79-85.
4. Glasscock ME 3rd, Dickins JR, Wiet R. Cholesteatoma in children. Laryngoscope. 1981;91(10):1743-53.
5. Sanna M, Zini C, Gamoletti R, Delogu P, Russo A, Scandellari R, Taibah A. The surgical management of childhood cholesteatoma. J Laryngol Otol. 1987;101(12):1221-6.
6. Sheehy JL. Cholesteatoma surgery in children. Am J Otol. 1985;6(2):170-2.
7. Lim DJ, Saunders WE. Acquired cholesteatoma: light and electron microscopic observations. Ann Otol 1972;81:2-12.
8. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol. 1984;133(4):1710-5.
9. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. J Pathol. 1992;168(4):357-63.
10. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med. 1995;1(1):27-31.
11. Dornelles Cde C, da Costa SS, Meurer L, Rosito LP, da Silva AR, Alves SL. Comparison of acquired cholesteatoma between pediatric and adult patients. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2009;266(10):1553-61.

- 12.Jin BJ, Min HJ, Jeong JH, Park CW, Lee SH. Expression of EGFR and Microvessel Density in Middle Ear Cholesteatoma. Clin Exp Otorhinolaryngol. 2011;4(2):67-71.
- 13.Kojima H, Tanaka Y, Tanaka T, Miyazaki H, Shiwa M, Kamide Y, Moriyama H. Cell proliferation and apoptosis in human middle ear cholesteatoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1998;124(3):261-4.
- 14.Park HJ, Park K. Expression of Fas/APO-1 and apoptosis of keratinocytes in human cholesteatoma. Laryngoscope 1999;109(4):613-6.
- 15.Olszewska E, Chodynicky S, Chyczewski L. Apoptosis in the pathogenesis of cholesteatoma in adults. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2006;263(5):409-13.
- 16.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.
- 17.Austin DF. Ossicular reconstruction. Otolaryngol Clin North Am 1972;5:145-60.
- 18.Kartush JM. Ossicular chain reconstruction: capitulum to malleus. Otolaryngol Clin North Am 1994;27:689-715.
- 19.Becvarovski Z, Kartush JM. Smoking and tympanoplasty: implications for prognosis and the Middle Ear Risk Index (MERI). Laryngoscope 2001;111:1806-11
- 20.Tos M, Lau T. Attic cholesteatoma. Recurrence rate related to observation time. Am J Otol. 1988;9(6):456-64.
- 21.Sudhoff H, Tos M. Pathogenesis of sinus cholesteatoma. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2007;264(10):1137-43
- 22.Yamamoto Y, Takahashi K, Morita Y, Takahashi S. Clinical behavior and pathogenesis of secondary acquired cholesteatoma with a tympanic membrane perforation. Acta Otolaryngol. 2013;133(10):1035-9
- 23.Weiss P. Cell contact. Int Rev Cytol. 1958;7:391-423.
- 24.Alves AL, Pereira CS, Carvalho MD, Fregnani JH, Ribeiro FQ. EGFR expression in acquired middle ear cholesteatoma in children and adults. Eur J Pediatr. 2011;171(2):307-10.
- 25.Preciado DA. Biology of cholesteatoma: special considerations in pediatric patients. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2012;76(3): 319-21.

26. Göçmen H, Kiliç R, Özdek A, Kizilkaya Z, Safak MA, Samim E. Surgical treatment of cholesteatoma in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2003;67(8):867-72.
27. Shirazi MA, Muzaffar K, Leonetti JP, Marzo S. Surgical treatment of pediatric cholesteatomas. *Laryngoscope*. 2006;116(9):1603-7.
28. De Zinis LO, Tonni D, Barezzani MG. Single-stage canal wall-down tympanoplasty: long-term results and prognostic factors. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2010;119(5):304-12.
29. Park KT, Song JJ, Moon SJ, Lee JH, Chang SO, Oh SH. Choice of approach for revision surgery in cases with recurring chronic otitis media with cholesteatoma after the canal wall up procedure. *Auris Nasus Larynx*. 2011;38(2):190-5.
30. Edelstein DR, Parisier SC, Ahuja GS, Juarbe C, Chute P, Wenig S, Kaye SM. Cholesteatoma in the pediatric age group. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1988;97(1):23-9.
31. Palva A, Karma P, Kärjä J. Cholesteatoma in children. *Arch Otolaryngol*. 1977;103(2):74-7.
32. Quaranta A, Ressa L, Santangelo A. Otomastoid cholesteatoma in children: histopathological findings. *Int J Pediatric Otorhinolaryngol* 1986; 12(2): 121-6.
33. 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.
34. Dornelles C, da Costa SS, Meurer L, Schweiger C. Correlation of cholesteatomas perimatrix thickness with patient's age. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2005;71(6):792-7.
35. Olszewska E, Lautermann J, Koc C, Schwaab M, Dazert S, Hildmann H, Sudhoff H. Cytokeratin expression pattern in congenital and acquired pediatric cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2005;262(9):731-6.
36. Welkoborsky HJ, Jacob RS, Hinni ML. Comparative analysis of the epithelium stroma interaction of acquired middle ear cholesteatoma in children and adults. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2007;264(8):841-8.
37. Dornelles C, Meurer L, Selaimen da Costa S, Schweiger C. Histologic description of acquired cholesteatomas: comparison between children and adults. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006;72(5):641-8.

38. Bujía J, Kim C, Holly A, 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(2):203-6.
39. Ergun S, Zheng X, Carlsoo B. Expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in middle ear cholesteatoma. *Am J Otol.* 1996; 17:393–396.
40. Alves AL, Pereira CS, Carvalho MD, Fregnani JH, Ribeiro FQ. EGFR expression in acquired middle ear cholesteatoma in children and adults. *Eur J Pediatr.* 2012;171(2):307-10
41. Wetmore RF, Konkle DF, Potsic WP, Handler SD. Cholesteatoma in the pediatric patient. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 1987;14(2-3):101-12.
42. Cruz OL, Takeuti M, Caldas Neto S, Miniti A. Clinical and surgical aspects of cholesteatomas in children. *Ear Nose Throat J.* 1990;69(8):530, 535-6.
43. Wang HM, Lin JC, Lee KW, Tai CF, Wang LF, Chang HM, Hsu YC, Chai CY, Ho KY. Analysis of mastoid findings at surgery to treat middle ear cholesteatoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;132(12):1307-10.
44. Ozbek C, Tuna E, Ciftci O, Yazkan O, Ozdem C. Incidence of fallopian canal dehiscence at surgery for chronic otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009;266(3):357-62.
45. Maresh A, Martins OF, Victor JD, Selesnick SH. Using surgical observations of ossicular erosion patterns to characterize cholesteatoma growth. *Otol Neurotol.* 2011;32(8):1239-42.
46. Magliulo G, Colicchio MG, Appiani MC. Facial nerve dehiscence and cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2011;120(4):261-7.
47. Mallet Y, Nouwen J, Lecomte-Houcke M, Desaulty A. Aggressiveness and quantification of epithelial proliferation of middle ear cholesteatoma by MIB1. *Laryngoscope.* 2003;113(2):328-31.
48. Moreano EH, Paparella MM, Zeltermann D, Goycoolea MV. Prevalence of facial canal dehiscence and of persistent stapedia artery in the human middle ear: a report of 1000 temporal bones. *Laryngoscope* 1994;104(3):309-20.
49. Li D, Cao Y. Facial canal dehiscence: a report of 1,465 stapes operations. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105(6):467-71.

50. Selesnick SH, Lynn-Macrae AG. The incidence of facial nerve dehiscence at surgery for cholesteatoma. *Otol Neurotol.* 2001;22(2):129-32.
51. Lin JC, Ho KY, Kuo WR, Wang LF, Chai CY, Tsai SM. Incidence of dehiscence of the facial nerve at surgery for middle ear cholesteatoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;131(4):452-6.
52. Moody MW, Lambert PR. Incidence of dehiscence of the facial nerve in 416 cases of cholesteatoma. *Otol Neurotol.* 2007;28(3):400-4.
53. Magliulo G, Terranova G, Varacalli S, Sepe C. Labyrinthine fistula as a complication of cholesteatoma. *Am J Otol.* 1997;18(6):697-701.
54. Gersdorff MC, Nouwen J, Decat M, Degols JC, Bosch P. Labyrinthine fistula after cholesteatomatous chronic otitis media. *Am J Otol.* 2000 Jan;21(1):32-5.
55. Stammberger M, Bujía J, Schulz P. Correlation of vascular morphology with clinical types in cholesteatoma of the middle ear. *Am J Otol.* 1994;15(3):380-2.
56. Sudhoff H, Dazert S, Gonzales AM, Borkowski G, Park SY, Baird A, et al. Angiogenesis and angiogenic growth factors in middle ear cholesteatoma. *Am J Otol.* 2000;21(6):793-8.
57. 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(3):377-82.