

ARAŞTIRMA / RESEARCH ARTICLE

Edinilmiş kolesteatomda Langerhans hücrelerinin yeri: İleriye yönelik kontrollü kör klinik çalışma

M.V. Akdoğan, İ. Yılmaz, T. Canbolat, L.N. Özlüoğlu

Özet

Amaç: Langerhans hücrelerinin orta kulak kolesteatom patogenezi nasıl bir rol oynadığını, kolesteatomlu kulağın klinik özellikleri ile ilişkisini, bir hücre çoğalması belirleyicisi olan Ki-67 ile ve apoptozis mekanizması ile olan ilişkilerini araştırmak.

Yöntem: Kliniğimizde 2007-2008 yıllarında edinilmiş kolesteatomlu kronik otit tanısıyla ameliyat edilen 33 hasta çalışmaya alındı. Klinik ve patolojik özellikler karşılaştırıldı. Klinik olarak hastalık süresi, işitme durumu, bilgisayarlı tomografi (BT) ve ameliyat bulguları not edildi. Patolojide, hastaların klinik durumlarından haberdar olmadan, 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, ki-kare testi, Student T-test, Mann-Whitney U testleri kullanıldı; p<.05 anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Çalışmaya alınan 20'si erkek, 13'ü kadın 33 hastanın yaş ortalaması 36±16 yıl (aralık 7-62) idi. Hastalık süresi 12±10 yıl (aralık 1-35), ortalama saf ses ortalaması 56±18 dB (aralık 8-90) ve ortalama hava kemik aralığı 32±12 dB (aralık 10-54) idi. BT'de 28 (%85) olguda mastoid kemikle sınırlı hastalık varken 5 (%15) olguda temporal kemik dışına çıkmış hastalık vardı. Yüzde 33 (n=11) hastada tüm kemikçikler yıkılmışken, %30 hastada (n=10) malleus ve inkus yıkılmıştı. Yedi olguda (%21) kapalı teknik, 26 (%79) olguda açık teknik kullanıldı. Ameliyat sırasında 7 olguda (%21) fasiyal kanalın, 6 olguda (%18) lateral semisirküler kanalın açıkta olduğu; 8 olguda (%24) tegmen

mastoideumda eksiklik olduğu; 18 olguda (%55) skutumun yeneği olduğu görüldü. Patolojik incelemeye göre Langerhans hücrelerinin kolesteatom epitelinde (ortalama 25±9 hücre/saha) dış kulak yoluna göre (ortalama 8±5 hücre/saha) daha yoğun toplandığı (p<0.001), Ki-67 indeksinin kolesteatom epitelinde (ortalama 39±15'e karşı 13±9) daha yüksek olduğu (p<0.001), apoptozisin kolesteatom epitelinde (ortalama 45±14'e karşı 18±11) daha belirgin olduğu (p<0.001) saptandı. Klinik ve patolojik bulgular arasındaki tek anlamlı ilişki açık teknik yapılan olgularda Ki-67 indeksi (p=0.018) ve apoptozis yoğunluğunun (p=0.037) kapalı teknik kullanılanlara göre daha yüksek olması idi.

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

Türk Otolarengoloji Arşivi, 2008; 46(3): 175-178

Giriş

Orta kulak kolesteatomu keratinize epitelin kulak zarının medialinde bulunmasıdır. Birincil edinilmiş kolesteatoma oluşumunda 4 ayrı mekanizmadan bahsedilir: 1) orta kulak mukozasının yassı epitele metaplazisi, 2) bazal keratinositlerin bazal laminayı geçerek kulak zarının lamina propriası içine doğru göç etmeleri, 3) kulak zarındaki bir delik yoluyla epi-

Dr. M. Volkan Akdoğan, Dr. İsmail Yılmaz, Dr. Levent N. Özlüoğlu
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı, Ankara

Dr. Tuba Canbolat
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Ankara

telin içeriye doğru büyümesi, 4) kulak zarının pars flaksida bölgesinin retraksiyonu (invagination).^{1,2}

Edinilmiş kolesteatoma patogeneğinde en çok kabul gören teori invajinasyondur. Retraksiyon cebinin kendini temizleyememesi ve keratin debrislerin birikimi bakteri üremesine, olaya eklenen süperenfeksiyonlar kronik enfeksiyona ve epitel çoğalmasına yol açmaktadır. Bu ise Langerhans hücre tutulumu, T-lenfositler ve etkin makrofajlar gibi farklı bağışık yanıtlarla sitokin düzeylerini artırmaktadır. Artan sitokinlerin aracılık ettiği enflamasyon, hücre çoğalması ve kemik yıkımı ile mikro çevrede büyüme teşvik edilmektedir.^{1,3,4}

Langerhans hücreleri çoğunlukla epidermiste lokalize dentritik hücrelerdir. Langerhans hücrelerinin kütanöz savunma sistemindeki rolü antijen sunucu hücre olarak rol oynamalarından kaynaklanır.^{4,6} Kolesteatoma epitelindeki Langerhans hücrelerinin de benzer şekilde etyopatogeneşte antijen sunucu hücreler olarak rol oynaması beklenmektedir. Langerhans hücre infiltrasyonunun çeşitli kanserlerde prognostik açıdan anlamlı olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmalarda artan infiltrasyonun daha iyi prognozu gösterdiği tespit edilmiştir.⁷

Hücre çoğalması yönünde yapılan çalışmalarda Ki-67 ile immünohistokimyasal olarak işaretlenmiş hücrelerin çoğalma göstergesini (proliferasyon indeksi) belirlemede en önde gelen yöntemlerden birisi olduğu tespit edilmiştir.^{8,9}

Apoptozis ile ilgili yapılan çalışmalarda kolesteatom patogeneğinde önemli rol oynadığı, keratin debrislerin farklılaşma ve birikiminin bir parçası olduğu bildirilmiştir. Kolesteatom epitelinde apoptozisin mekanizmasını ve apoptozis kapasitesini bilmek, bu sık görülen kulak hastalığının özgül davranışlarını açıklamada, hastalığın saldırganlığı hakkında bilgi sahibi olmada ve tekrar etme eğiliminin tespit etmede önemli bilgilere ışık tutabilir.¹⁰

Bu çalışmada amaç Langerhans hücrelerinin orta kulak kolesteatom patogeneğinde nasıl bir rol oynadığını, kolesteatomlu kulağın klinik özellikleri ile ilişkisini, bir hücre çoğalması belirleyicisi olan Ki-67 ile ve apoptozis mekanizması ile olan ilişkilerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Kliniğimizde 2007-2008 yıllarında edinilmiş kolesteatomlu kronik otit tanısıyla ameliyat edilen 33 hasta çalışmaya dahil edildi, klinik ve patolojik özellikler karşılaştırıldı.

Klinik olarak hastalık süresi, işitme durumu, bilgisayarlı tomografide (BT) yaygınlık ve ameliyat bulguları not edildi.

Ameliyat edilen hastalardan rutin cerrahi işlem sırasında alınan kolesteatom ve dış kulak yolu cildi (=kontrol gurubu) biyopsi örnekleri patoloji bölümüne %4'lük formaldehit solüsyonunda gönderildi. Hematoksilen eozin boyama işlemi yapılan kesitler ışık mikroskopu altında değerlendirilerek immünohistokimyasal boyama için parafin bloklara alındı ve her doku bloğundan 5 mikrometre kalınlığında seri kesitler elde edildi. Bu kesitler Langerhans hücre varlığını belirlemek için biotin-streptavidin kompleks sistemi ile (ACE+ Substrat chromogene Ready to Use, K3469, DAKO, Danimarka), CD1a (NeoMarkers, MS.1856, R7) için Detect Super Stain System HRP kiti (Labs Inc. IDST 1007) kullanılarak işaretlendi. Uygun büyütme altında (x40) en çok boyanan 3 alandaki 100 hücrede CD1a ile boyanan Langerhans hücre sayısı belirlendi. Böylece hastaların klinik durumlarından haberdar olmadan, Langerhans hücrelerinin kolesteatomdaki ve dış kulak yolu cildindeki dağılımı hesaplandı.

Ki-67 ekspresyonunu belirlemek için parafin bloklara alınmış olan kesitler 'poly-l-lysine'li lamlara alındı. Ki-67 (SP6) (Neomarker, ABD) için, monoklonal tavşan antikoru ile işaretlenerek Langerhans hücrelerinde olduğu gibi x40 büyütme altında en çok boyanan 3 alandaki 100 hücrede Ki-67 ile boyanan hücre sayısı belirlendi.

Apoptozisin tespitinde TUNEL yöntemi kullanıldı. Bu değerlendirme için ApopTag insutu değerlendirme kiti (S7101; Intergen, Purchase, NY, ABD) kullanıldı. Uygun büyütme (x40) altında en çok boyanan 3 alandaki 100 hücrede apoptotik hücre oranları tespit edildi.

İmmünohistokimyasal analizlerin yanı sıra kolesteatomun epitel kalınlığı ve kolesteatomdaki inflamasyon yoğunluğu saptandı.

Verilerin istatistik değerlendirmesinde Levene testi, Student T-test, Mann-Whitney U testleri kullanıldı, $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Çalışmaya alınan 20'si erkek, 13'ü kadın 33 hastanın yaş ortalaması 36 ± 16 yıl (aralık 7-62) idi. Hastalık süresi 12 ± 10 yıl (aralık 1-35), ortalama saf ses ortalaması 56 ± 18 dB (aralık 8-90) ve ortalama hava kemik aralığı 32 ± 12 dB (aralık 10-54) idi. BT'de 28 (%85) olguda mastoid kemikle sınırlı hastalık varken 5 (%15) olguda temporal kemik dışına çıkmış hastalık vardı. Yüzde 33 (n=11) hastada tüm kemikçikler yıkılmışken, %30 hastada (n=10) malleus ve inkus yıkılmıştı. Yedi olguda (%21) kapalı teknik, 26 (%79) olguda açık teknik kullanıldı. Ameliyat sırasında 7 olguda (%21) fasiyal kanalın, 6 olguda (%18) lateral semisirküler kanalın açıkta olduğu; 8 olguda (%24) tegmen mastoideumda eksiklik olduğu; 18 olguda (%55) skutumun yenik olduğu görüldü. Patolojik incelemeye göre Langerhans hücrelerinin kolesteatom epitelinde (ortalama 25 ± 9 hücre/saha) dış kulak yoluna göre (ortalama 8 ± 5 hücre/saha) daha yoğun toplandığı ($p < 0.001$), Ki-67 indeksinin kolesteatom epitelinde (ortalama 39 ± 15 'e karşı 13 ± 9) daha yüksek olduğu ($p < 0.001$), apoptozisin kolesteatom epitelinde (ortalama 45 ± 14 'e karşı 18 ± 11) daha belirgin olduğu ($p < 0.001$) saptandı. Klinik ve patolojik bulgular arasındaki tek anlamlı ilişki açık teknik yapılan olgularda Ki-67 indeksi ($p = 0.018$) ve apoptozis yo-

ğunluğunun ($p = 0.037$) kapalı teknik kullanılanlara göre daha yüksek olması idi.

Tartışma

Kolesteatom orta kulağın histopatolojik olarak benign, klinik olarak agresif ve invazif potansiyeli olan bir hastalıktır. Orta ve iç kulak yapılarını destrükte ederek işitme azlığı, vestibüler disfonksiyon, fasiyal paralizi ve ölümcül intrakranial komplikasyonlara neden olabilir.¹⁰

Daha önceki çalışmalarda kolesteatom patogenezi üç ana başlık temelinde araştırılmıştır: a) hücre farklılaşması, b) hücre çoğalması, c) apoptozis mekanizmaları.³ Son 10 yılda kulak kolesteatom patogenezi üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında, süreci neoplastik oluşumlara benzetme ve patogenezi de bu yönde şekillendirme çabalarının artmış olduğu görülmektedir. 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 yararlanılmıştır.

Langerhans hücreleri kolesteatom epitelinde varlığı bilinen hücrelerdir. Gantz⁴ yaptığı çalışmada normal timpanik membranda, dış kulak yolu epitelinde ve kolesteatom matriksinde Langerhans hücrelerinin morfolojilerini birbiri ile karşılaştırmıştır. Kolesteatom matriksinde hem dış kulak yolu cildine hem de kulak zarına göre daha fazla Langerhans hücresi tespit etmiştir. 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 topluluğu ise kronik inflamatuar sürecin bir sonucu olarak yorumlanmıştır. Ayrıca bu hücrelerdeki artmış sitoplazmik granüller, artmış sekretuar özelliklere de işaret etmektedir ve bu durum deride görülen kontakt aşırı duyarlılık reaksiyonları ile benzerdir.^{4,12} Bizim yaptığımız çalışma

da da Langerhans hücre sayıları kolesteatom epitelinde kontrol gurubuna (dış kulak yol cildi) göre istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur.

Huisman ve ark.¹³ kolesteatom ve normal deride hücre çoğalması ve döngüsü ile apoptozis arasında farklılık olup olmadığını incelemişlerdir. Kolesteatomdan ve kontrol gurubundan (retroauriküler deri dokusu) alınan örnekler Ki-67, p53, p21 ve aktif kaspaz 3 düzeyleri açısından karşılaştırılmıştır. Kolesteatom örneklerinde Ki-67 (+) hücrelerin oranı retroauriküler deri örneklerine göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.¹³ Çalışmamızda da benzer sonuç elde edilmiş, kolesteatomdaki Ki-67 belirteci dış kulak yolu cildine göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Apoptozisin kolesteatom patogeneğinde önemli bir yeri olduğu; keratin debrislerin farklılaşması, birikimi ve sonuçta kolesteatomun genişlemesinde rol oynadığı Olszewska ve ark. tarafından ortaya konmuştur. Kolesteatom epitelindeki APO2.7 (+) hücre oranının normal deri ile karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir.¹⁰ Huisman ve ark. ise apoptozis oranını tespit etmekte kullanılan kaspaz 3 aktivitesi ve TUNEL metodunda tespit edilen pozitif hücre sayılarını düşük bulmuşlar, kolesteatom örneklerinde apoptozis oranında bir artış olmadığını ileri sürmüşlerdir.¹³ Çalışmamızdaki apoptotik hücre oranları Olszewska ve ark.'nın sonuçları ile benzer olup, kolesteatom epitelinde istatistik anlamlılıkta yüksek saptanmıştır.

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

Apotac boyamaları ile desteklendiği bulunmuştur. Hücre çoğalması ve programlı hücre ölümünün daha yoğun olduğu olgulardaki tedavi seçeneğimiz olan açık tekniğin isabetli bir seçim olduğu görülmüştür.

Kaynaklar

1. **Semaan MT, Megerian CA.** The pathophysiology of cholesteatoma. *Otolaryngol Clin North Am* 2006; 39: 1143-59.
2. **Tinling SP, Chole RA.** Gerbilline cholesteatoma development. Part II: temporal histopathologic changes in the tympanic membrane and middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 134: 953-60.
3. **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: 706-11.
4. **Gantz BJ.** Epidermal Langerhans cells in cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1984; 93(2 Pt 1): 150-6.
5. **Silberberg-Sinakin I, Gigli I, Baer R, Thorbecke G.** Langerhans cells: role in contact ipersensitivity and relationship to lymphoid dendritic cells and to macrophages. *Immunol Rev* 1980; 53: 203-32.
6. **Thorbecke G, Silberberg-Sinakin I, Flotte T.** Langerhans cells as macrophages in skin and lymphoid organs. *J Invest Dermatol* 1980; 74:2-43.
7. **Gallo O, Asprella L, Gallina E, et al.** Langerhans cells related to prognosis in patients with laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; 117: 1007-10.
8. **Lee SH, Jang YH, Tae K, et al.** Telomerase activity and cell proliferation index in cholesteatoma. *Acta Otolaryngol* 2005; 125: 707-12.
9. **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.
10. **Olszewska E, Chodyncki S, Chyczewski L.** Apoptosis in the pathogenesis of cholesteatoma in adults. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006; 263: 409-13.
11. **Bujia J, Holly A, Sudhoff H, Antoli-Candela F, TapiaMG, 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.
12. **Gantz B, Maynard J, Bumsted R, Huang C, Abramson M.** Bone resorption in chronic otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1979; 88: 693-700.
13. **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.

Bağlantı Çakışması:

Bağlantı çakışması bulunmadığı belirtilmiştir.

İletişim Adresi: Dr. M. Volkan Akdoğan

Başkent Üniversitesi KBB Anabilim Dalı

Bahçelievler 6. Cad. 72/2 ANKARA

Tel: +90 312 223 85 34

e-posta: drmvolkan@yahoo.com.tr