

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI

**P53 TÜMÖR SUPRESÖR GENİNİN KOLESTEATOM
ETYOPATOGENEZİNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Arş. Gör. Dr. İlyas DİŞİKIRIK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Muzaffer KANLIKAMA

Gaziantep-2000

SONUÇLAR	41
ÖZET	42-43
İNGİLİZCE ÖZET	44
KAYNAKLAR	45-48

TEŐEKKÜR

Çalıőmamın histopatolojik kısmını özenle yapan patoloji anabilim dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Kemal Bakır ve Arş. Gör.Dr. Ramazan Uçak'a teőekkürü bir borç bilirim.

KISALTMALAR

CK.....	Cytokreatinin
EGF.....	Epidermal growth faktör
DNA.....	Deoksiribonükleik Asit
HRCT.....	High Resolution Computed Tomography.
HSP.....	Heat Shock Proteins
LSSK.....	Lateral Semisürküler Kanal
MRI.....	Magnetik Rezonas Görüntüleme
PCNA.....	Proliferatif Hücre Nükler Antijen
TNF.....	Tümör Nekrosiz Faktör

TABLO LİSTESİ

TABLolar	SAYFA NO:
Tablo1 :Koleteatomayı tarif etmekte kullanılmış olan terimler.....	3
Tablo2:P53 Geninin Fonksiyonel Şeması.....	26
Tablo3:Çalışma Kontrol Grubundaki P53 İmmünohistokimya sonuçları....	29
Tablo4:Primer ve Sekonder Kolesteatomalardaki P53 immünohistokimya sonuçları.....	30
Tablo5: P53 immünohistokimyasının cinsiyete göre değişimi.....	30

ŞEKİLLER**SAYFA NO:**

Şekil1 :Koleteatomadaki kemik tahrip mekanizması.....	4
Şekil2: Derinin katmanları.....	19
Şekil3: Keratinositlerin yapısı.....	20

RESİMLER

SAYFA NO:

Resim 1. Kolesteatoma olgusunda çok katlı yassı epitelde P53(-) boyanma.....	32
Resim 2. Kolesteatoma olgusunda bazal membranda P53(+) nükleer boyanma.....	32
Resim 3. Kolesteatoma olgusunda bazal membranda P53(+) nükleer boyanma..	33
Resim 4. Kolesteatoma olgusunda stratum spinozum ve stratum bazale'de P53 (+) nükleer boyanma	33
Resim 5. Kolesteatoma olgusunda bazal membranda P53(+) nükleer boyanma.....	34

GİRİŞ VE AMAÇ

Kolesteatom, işgücü kaybı, ölümcül sonlanabilen komplikasyonlar ve bırakabileceği sekeller açısından önem taşımaktadır. Bu yönüyle günümüzde hala önemli bir sağlık sorunu olmaya devam eden kolesteatomların patogenezinin aydınlatılması sürekli araştırmacıların ilgisini çekmektedir.

Kolesteatomanın oluş mekanizmalarının bilinmesi tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Bu nedenle, kolesteatomanın etyopatogenezi hakkında çeşitli çalışmalar yapılmış ve bu konuda bazı teoriler öne sürülmüştür (1).

Etyopatogenesizine yönelik yapılan çalışmalar sonucu, kolesteatomun aşırı hücre proliferasyonu ile giden bir hastalık olabileceği iddia edilmiştir (2). Buradan yola çıkarak yapılan ileri çalışmalarda, hücre proliferasyonuna etkisi olabilen sitokreatinler, Ki67, epidermal growth faktör vs. gibi faktörlerin kolesteatom gelişiminde rolü olabileceği ileri sürülmüştür (3-5). Ayrıca kolesteatomun kemik destrüksiyonunda Tümör Nekrosis Faktör'ün (TNF) rolü araştırılmıştır (6).

Yaptığımız kaynak çalışmaları sonucu, zaman zaman bir neoplazi gibi davranan kolesteatoma hakkında bu kadar çeşitli araştırmalar yapılırken, birçok neoplazide araştırılan ve bir tümör süpresör gen olan P53 geninin kolesteatomdaki rolü hakkında yeterli çalışmaların yapılmadığı dikkatimizi çekti. Literatürdeki konuyla ilgili az sayıdaki çalışmada, mutant P53 geninin kolesteatomlarda normalden daha yüksek olduğu iddia edilmektedir (7). Konuya açıklık kazandırabilmek ve bir tümör süpresör geni olan P53' ün kolesteatomdaki rolünü ortaya koyabilmek amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

GENEL BİLGİLER

A-KOLESTEATOMA

İ- TANIMI

Kolesteatomayı tanımlamak için uzun yıllar boyunca çeşitli tabirler kullanılmıştır. Kolesteatoma ilk kez 1829'da Cruveilhier tarafından tanımlanmış ve yazar kolesteatomayı temporal kemiğin inci tümörü olarak tarif etmiştir. Bununla birlikte kolesteatoma tabiri ilk kez 1838'de Alman biyokimyacı Johannes Müller tarafından kullanılmıştır. Günümüzde, genellikle kolesteatoma orta kulak kavitesinde keratin debris birikimi ile karakterize benign bir hastalık olarak tarif edilebileceği gibi, mastoidin epidermal inklüzyon kisti olarak da tanımlanmaktadır (1). Tablo 1'de literatürde rastlanabilen terimler liste halinde verilmiştir.

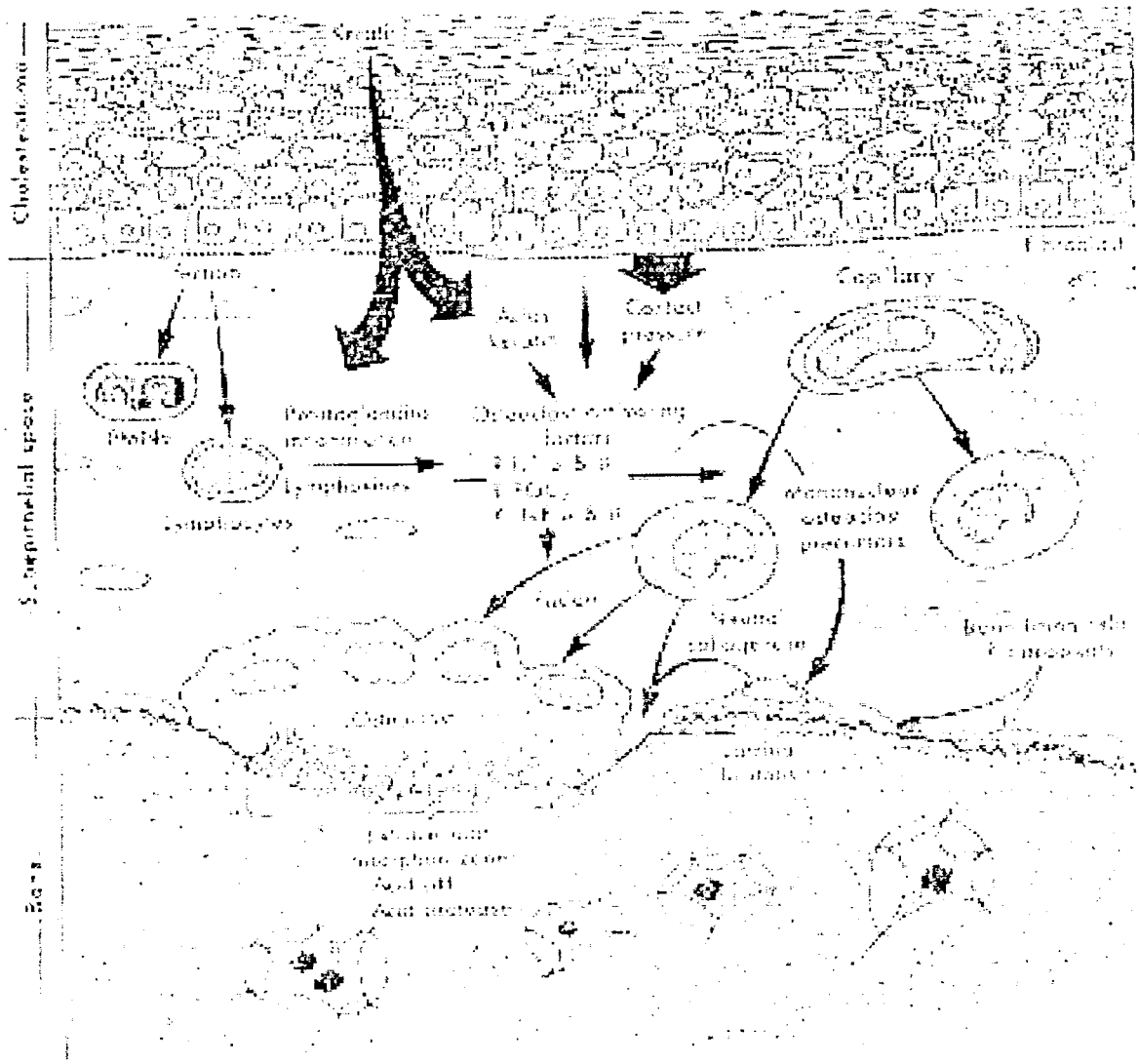
Kolesteatoma kabaca dört özelliği nedeniyle klinik açıdan önem kazanır. Bunlar; kısmen de olsa kontrolsüz hücre proliferasyonu, hücresel farklılaşmasında koordinasyon bozukluğu, epitel göçü ve invazyondur.

Kolesteatoma benign bir hastalık olmasına rağmen lokal olarak agresif bir özelliğe sahiptir. Kolesteatoma matriksi büyürken veya kolesteatoma kesesi genişlerken çevre kemik yapıları da tahrip ederler (şekil 1). Kolesteatoma tarafından salgılanan peptidase, mast cell spesifik protease, serine protease, metaloproteinase ve cathepsinase gibi enzimler kemik destrüksiyonunda rol oynarlar (1).

Aural kolesteatomanın patoloji ve patogenezi hakkında çeşitli teoriler öne sürülmüş olmakla birlikte, kolesteatomanın oluşmasını açıklayabilmek için birden fazla teoriye ihtiyaç vardır. Bu teoriler "kolesteatomanın patogenezi " bölümünde daha detaylı olarak ele alınmıştır.

Tablo 1. Kolesteatomayı tarif etmede kullanılmış olan terimler (8).

Terimler	Yazarlar	Yıl
Steatoma	Du Verney	1683
Margaritoma	Craigie	1828
Pearly Tumour	Cruveilhier	1829
Cholestatoma	Müller	1838
Pearly Squamos Carcinoma	Cornil ve Ranvier	1891
Epidermal Cholestatoma	Cushing	1922
Epidermoid	Critchley ve Ferguson	1928
Cholesteatosis	Young	1950
Black Cholesteatosis	Birrell	1956
Squamos Cholesteatosis	Birrell	1958
Squamous Epitheliosis	Birrell	1958
Epidermosis	Tumarkin	1958
Epidermoid Cholesteatoma	Frietmann	1959
Keratoma	Harris ve Weiss	1962
Keratosis	McGuckin	1962
Epidermoid Cyst	Ferlito	1970



Şekil 1. Kolesteatomadaki kemik tahrip mekanizması (1).

İİ-TARİHÇE

Kolesteatoma tabiri ilk kez 1838'de bir Alman biyokimyacı olan Johannes Müller tarafından kullanılmıştır. Müller, kolesteatomayı kimyasal olarak analiz etmiş ve içeriğinde safra asitleri ile ağır yağlar bulunduğunu tespit etmiştir. Bunun üzerine chole (safra), stearin (yağ) ve oma (tümör) kelimelerini birleştirerek kolesteatoma terimini üretmiştir (8). Kolesteatoma tabiri uzun yıllardan beri otolojinin deyimleri arasına girdi ve yaygınlaştı.

Kolesteatoma yaptığı önemli komplikasyonlar nedeniyle otolojik cerrahinin gelişmesini sağlayan en önemli faktörlerden birisi olmuştur. Schwartze 1873 yılında mastoidektomi indikasyon ve tekniğini bildirdi. Yine 1873 yılında von Tröltsch kronik otitlerde bu tekniği uyguladı. Arka duvarın alınmasını ilk kez von Bergmann önerdi. Ancak 1890 yılında Zaufal radikal ameliyatların tekniğini tanımladı. Stacke Bir yıl sonra meatoplastiyi tarif etti. Bondy 1910 yılında modifiye radikal mastoidektomiyi ileri sürdü. 1951 yılında Zöllner ve Wullstein timpanoplastiyi geliştirdiler (9).

iii- HİSTOLOJİSİ

Kolesteatoma kitlesi canlı ve cansız olmak üzere iki kısımdan oluşur. Canlı kısım çevrededir ve matriks adını alır. Komşu periosta sıkı bir şekilde yapışmıştır, bazen kemiğin içine doğru uzantılar gönderir, fakat kemik dokusu ve havers kanalları sağlamdır. Matriks, sürekli olarak epiderm lamelleri doğurur. Bunlar tıpkı bir soğan zarı gibi üst üste yığılır, parlak sedef renginde yuvarlak bir kitle yaparlar. Epiderm lamellerinin içinde yer yer çekirdek artıklarına rastlanır. Epiderm lamellerinin çözülmesinden ağır yağ asitleri açığa çıkar. Bunlar çok kötü kokuludur ve kolesteatomun kendine has kokusunu oluşturur (10).

Histolojik olarak kolesteatoma normal deriden bazı özellikleri nedeniyle farklıdır. Elektron mikroskopla yapılan araştırmalara göre normal deride üç çeşit hücre bulunur: Keratinosit, melanosit ve langerhans hücreleri. Kolesteatomalarda melanositlere ve Langerhans hücrelerine rastlanmaz. Pigmentin yokluğu, kolesteatomun, neden sedef gibi parlak beyaz olduğunu açıklar.

IV- PATOGENEZİ

Kolesteatomun patogenezi üzerine yapılan çalışmalar bir yüzyılı aşkın süredir devam etmekle beraber hastalığın kesin oluş mekanizması hala karanlıktır. Hastalığın patogenezi hakkında çok çeşitli görüşler ortaya atılmıştır. Kolesteatoma patogenezi izah etmede kullanılan teorileri 5 temel grup altında incelemek mutad olmuştur. Bunlar:

- I- İnvajinasyon teorisi
- II- Epitelyal invazyon teorisi
- III- Bazal hücre hiperplazi teorisi
- IV- Metaplazi teorisi
- V- İmplantasyon teorisi

I-İnvajinasyon teorisi: İlk defa 1933 yılında Witmaack tarafından ortaya atılmış bir teoridir. Muhtemelen tekrarlayan enflamasyonlar ve negatif orta kulak basıncına bağlı pars flaccidanın emilmesiyle retraksiyon poşunun oluşması ve deskuame keratinin temizlenme mekanizmasında bozukluğa bağlı kolesteatoma oluşur (1).

Bu retraksiyon poşu kolesteatomalarının oluşumunun tuba disfonksiyonu ile meydana gelen negatif orta kulak basıncına bağlı olduğu görüşü hakimdir. Kolesteatomun bu tipinde, timpanik membranın posterior superior kadranında defekt ve komşu kanal duvarında erozyon gözlenir.

Sade (11) retraksiyon poşu içerisinde epitelyal migrasyon örnekleri gözlemlemiştir. Bu teoriyi destekleyen yakın geçmişte yapılmış çalışmalar mevcuttur. Chole ve arkadaşları (12) tarafından 1981 yılında yapılan bir çalışmada denek hayvanlarında timpanik membranda spontan olarak gelişen keratin birikiminin invaziv aural kolesteatomaya yol açtığını bulmuşlar ve bu teoriyi desteklemişlerdir.

Normal dış kulak yolu epidermisi ile involucrin gibi kolesteatomanın terminal diferansiyasyon proteinleri ve transgulitaninaz aktiviteleri benzer özellikler göstermektedir ve bu durum bize kolesteatomanın, dış kulak yolu kanalı ve kulak zarı epidermisinin orta kulak kavitesine invazyon veya invajinasyonundan orijin aldığını düşündürür (13,14).

II- Epitelyal invazyon teorisi: Bu teori binsekizyüzlü yılların sonlarına doğru ortaya atılmış bir teoridir. Timpanik membrandaki bir perforasyondan orta kulak içine skuamöz epitelin invazyonu veya migrasyonu söz konusudur. Bu teori klinik gözlemler ve deneysel çalışmalarla desteklenmiştir (15).

Enfeksiyon yokluğunda normal orta kulak mukozasının kolumnar epiteli ile dış kulak yolu stratifeye skuamöz epiteli karşılaştığı zaman iki epitel birbirini tanır ve iki epitel arasında bir kavşak oluşur. Bu kavşak çizgisi pars tensanın biraz mediyalindedir. Timpanik kavite ve orta kulaktaki kronik enfeksiyon tetiği çekerek bu eklem çizgisini anstabil hale getirebilir ve böylece skuamöz epitel kolumnar epitel üzerinden içe doğru büyür (1,16).

Weiss (17) 1958 yılında yaptığı bir çalışmada epitelyal hücrelerin diğer epitelyal hücrelerle karşılaştığında hücre göçünün durduğunu gözlemlemiştir. Yazar bunu kontakt inhibisyon olarak adlandırmıştır.

Palva ve arkadaşları (18) bu teori için temporal kemikte histolojik kanıtlar göstermiştir. Temporal kemikteki fraktürlerden sonra kolesteatomanın gelişmesi bu teoriyle açıklanabilir.

Wittmaac (19), 1933 yılında tuba tıkanıklığı olmadan da attik bölgesine kulak zarının çökebileceğini bildirdi. Attik bölgesinde embriyonik hiperplastik

mukoperiosteumun kaldığını ve kulak zarı ile yapışıklıklar yaparak yer yer cepler oluşturduğunu iddia etti. Bu olay, 1963 yılında Richartson (20), tarafından da doğrulandı. Lange (21), 1925 yılında kulak zarının pars flacida bölgesinde epidermisin iğne biçiminde hücreler (prickle cell) içerdiğini, Shrapnell zarında ne çekilme ne de çökme olmadan, herhangi bir iltihabi olay sonucunda bunların hipertrofiye uğrayabileceğini ve meydana gelen yeni bazal hücrelerin submüköz doku içine yerleşebileceğini bildirdi.

iii- Bazal hücre hiperplazisi teorisi: İlk defa bindokuzyüz yirmili yılların başlarında ortaya atılmıştır. Bu teoride pars flaccidanın dış kısmındaki epithelyal hücreler enflamasyon sonucu subepithelyal tabakaya geçer ve attik kolesteatomuna neden olur (1). Bu teori ile intakt zar arkasında oluşan kolesteatomanın patogenezi açıklanabilir.

Ruedi (22) yetişkinlerin otopsileri üzerinde çalışarak dış kulak yolu derisinin arka üst kadranındaki kısmının anormal bir gelişme gücüne sahip olduğunu gösterdi. Epitelin bazal lamina içerisine invaze olması için bazal laminada değişiklik olması gerekir. Bazal lamina ayrılması 1977 yılında Lim ve arkadaşları (23), 1984'de Chole ve Tinling (24), tarafından gösterildi. Basal laminadaki bu ayrılma subepithelyal konnektif doku içine epitel kolonilerinin invazyonuna ve mikro kolesteatomaların oluşmasına yol açar.

Tuba tıkanıklıkları, orta kulak iltihapları ve travma gibi durumlarda bazal tabaka komşu doku içine burjonlar gönderir. Kemik dokusunu rezorbe ederek orta kulak boşluğuna girer. Perforasyon ve iltihap bundan sonra gelişir. Ruedi bu görüşü histolojik bulgular ile desteklemiştir (22).

iv- Metaplazi teorisi: İlk defa Wendt (25), tarafından 1973 yılında ortaya atılmıştır. Orta kulak mukozasının keratinize epitele metaplastik transformasyonunu

ifade eder. Rekürren enfeksiyon ve enflamasyon ile orta kulakta ülserasyonlara rastlanır. Metaplazi enfeksiyon tarafından provake edilebilir. Aşırı kuruluk gibi faktörler önemli olabilir.

Orta kulak mukozasındaki metaplazinin tanısı zordur. Birrell (26), prickle hücrelerin varlığı olmaksızın kollesterol granülleri ile kaplı vakalarda orta kulak mukozasında metaplazi buldu.

Sade (27), 1979 yılında keratinize epitel adları içeren bazı efüzyonlu otitis medialis çocuklardan alınan biyopsi spesmenlerinde bu teoriyi destekleyen bulgular tespit etti. Cole ve Frush (28), şiddetli vitamin A yetmezliğinin ratlarda tuba östaki ve orta kulakta keratinize epitel transformasyonuna yol açtığını gösterdiler. Ancak yazarlar A vitamini yetmezliği teorisi insan kolesteatomalarının patogenezi hakkında yetersiz yetersiz olduğunu izah ettiler.

v-İmplantasyon teorisi: Timpanostomi tüpü takılması, timpanoplasti ameliyatları sırasında veya travmatik nedenlerle orta kulağa keratinize skuamöz epitelin implantasyonu sonucu kolesteatoma geliştiğini belirten teoridir (29). Zaman zaman pratik hayatta karşımıza çıkar.

V-KOLESTEATOMANIN SINIFLANDIRILMASI

Kolesteatomları pirimer akkiz kolesteatoma, sekonder akkiz kolesteatoma ve konjenital kolesteatoma olarak üç gruba ayırarak incelemek mümkündür.

I- Primer Akkiz Kolesteatoma: Perforasyon genellikle timpanik membranın pars flaksida bölgesinde sınırlıdır. Karakteristik özelliği stratifiye skuamöz epitelin orta kulak kavitesi içerisinde bulunmasıdır. Keratin transportunda bir defekt sonucu oluşur. Primer akkiz kolesteatomda östaki tüpü ve mezotimpanum patolojik değişikliklerden bağımsız olarak sıklıkla normal havalanma gösterir (1).

II- Sekonder Akkiz Kolesteatoma: Stratifiye skuamöz epitelin sıklıkla marjinal bir perforasyon ve ara sıra santral bir perforasyondan orta kulak kavitesine doğru invazyonu sonucu oluşur (1).

III- Konjenital Kolesteatoma: Temporal kemik içerisinde embriyonik epitelyal doku artıklarının bulunması sonucu gelişir. Hastalarda timpanik membran intakttır. Kulak enfeksiyonu veya cerrahisi anamnezi yoktur. Vakaların 2/3'ünde zarın anterosüperiorunda ve zarın gerisinde beyaz bir kitle olarak görülür. Ancak zarın içinde ve petröz apekte de yerleşebilir. Kolesteatomanın nadir görülen türü olan konjenital formunun ortalama görülme yaşı 4 – 5 yaşlarıdır. Erkek/ Kadın oranı 3 e 1 olarak belirtilmiştir (30).

Konjenital kolesteatomanın çoğunlukla ilk belirtisi fasial paralizidir. Bu kolesteatoma büyük boyutlara ulaşabilir, ilk defa radyolojik olarak tespit edilebilir ve genellikle yıllarca sessiz kalır. Michaels (31), 10 - 33 haftalık arasındaki fetüsün 68 temporal kemiğinin incelemesi sonucunda 37 vakada timpanik membranın anterior superior kesminde epidermoid formasyon bulmuştur. Bu epidermoid formasyon, ektodermal brankial yarığı, geriye doğru gelişmekte olan endodermal faringial poşun

ön kenarına doğru çekmekte organizatör bir rol oynar. Bu organizasyon fonksiyonu, gestasyonun 33. haftasında gözden kaybolur. Nadiren bazı vakalarda gözden kaybolmaz ve bu şekilde konjenital kolesteatoma oluşur (10,16,32).

VI-KOLESTEATOMANIN TANISI

Aural kolesteatomanın tanısı otoskopik muayene ve/veya cerrahi eksplorasyon ile yapılır. Histopatolojik inceleme tanıda yardımcı yöntem olarak kullanılır.

Semptomlar: Kolesteatoma semptomları farklılıklar gösterebilir. Bazı kolesteatoma vakaları asemptomatik olurken, bazıları hızlı kemik destrüksiyonu ile gidebilir. Bazı hastalarda yavaş ilerleyen işitme kaybı mevcuttur. Bir kısmında ise pürülan kulak akıntısı görülür. Kulak akıntısı genellikle kötü kokuludur. Çünkü, anaerobik bakterilerle enfektedir. Enfekte kolesteatomlar eksternal otit şeklinde yanlış tanı alabilir ve bu nedenle kanal debridmanının çok iyi yapılması gerekir. Bazı hastalarda vertigo ve labirent fistülüne bağlı işitme kaybı, fasiyal paralizi ve intrakraniyal enfeksiyon mevcut olabilir (1,15).

İşitme kaybı diğer önemli bir belirtidir. Ancak erken retraksiyon poşu kolesteatomlarında kemikcik hareketleri henüz engellenmeyebilir ve işitme normal bulunabilir. Bazen kolesteatoma ossicular zincirin arasına girerek iletim görevi yapabilir. Bu durumda işitme normale yakın bulunabilir. Postoperatif dönemde olabilecek işitme kayıpları bakımından hasta ve ailesini bu konuda uyarmak gerekir. İşitmedeki ani değişikliklerin hastayı KBB hekimine getirmesi daha muhtemeldir.

Kanama orta kulak kavitesindeki granülasyon veya polipe bağlı olabilir. Baş ağrısı, dura iritasyonuna veya eksternal otit sonucu ortaya çıkabilir. Bu durum hekimi intrakraniyal komplikasyon yönünden uyarmalıdır(15). Kulak ağrısı meatal derinin inflamasyonu ile olabileceği gibi sessiz bir kolesteatomanın ani reaktivasyonu ile veya ekstradural apse sonucundada görülebilir (15).

Kulak akıntısı fazla değildir bazan hastasının akıntıdan haberi yoktur. Bunlar özellikle attikde yeni başlamış kolesteatomalarda daha sık görülür. İlerlemiş eski

kolesteatomalarda akıntı bol ve kötü kokuludur, dış kulak yolunu deskuame lameller doldurur (15).

Baş dönmesi ve dengesizlik seröz labirentitin geliştiğini gösterir. Yahut dış kulak yolunu aspire etmek, polibe dokunmak hastada şiddetli baş dönmeleri başlatır. Bu zaman kolesteatomanın fistül meydana getirdiği anlaşılır. Yine kulak uğultusu kolesteatomlu kronik otitlerde sıklıkla görülen diğer bir belirtidir(15).

Muayene bulguları: Otoskobik muayenede çoğunlukla kulak zarının pars flaksida tabakasında veya posterior-süperior kadranda genellikle marjinal perforasyon tespit edilir. Ayrıca perforasyon içinden orta kulak mukozasının hipertrofik olduğu gözlenebilir. Yine perforasyondan yassı epitel adacıkları, kolesteatomanın kendisi ve çoğunlukla attikten kaynaklanan polipoid kitle gözlenebilir. Ayrıca dış kulak yolu pü ile dolu olabilir. Bu nedenle dış kulak yolundaki pü ün çok iyi aspire edilmesi gerekir. Bazen dış kulak yolu arka üst kısmında kurut olabilir bu kurut temizlendiği zaman attikteki perforasyon açığa çıkabilir. Yine otoskobik muayenede dış kulak yolu arka duvarının kolesteatomanın yaptığı kemik destrüksiyonuna bağlı olarak yenik olduğu ve dış kulak yolu arka üst duvarını çöktüğü gözlenebilir(1,15).

Radyolojik Yöntemler: Konvansional röntgenografinin temporal kemik hastalıklarının tanısındaki rolü sınırlıdır. Bu görüntüleme yöntemlerinden kısaca bahsetmek gerekirse, klinikte daha sık kullanmakta olduğumuz Schuller grafisi mastoidin havalanması ve sigmoid sinüsün pozisyonu hakkında bilgi verirken, temporal kemiğin derinliği, kemikçikler ve attik hakkında bilgi sağlamaz. Chausse pozisyonu, attik ve kemikçikler hakkında bilgi sağlar.

Transorbital grafi veya Guillen grafisi, iç kulak yolu hakkında bilgi verir. Owen grafisi, arka attik hakkında bilgi verir. Town grafisi sayesinde her iki kulağın mastoid

havalanması mukayese edilebilir. Ayrıca, orta kulak boşluğu, antrum, mandibuler kondil ve petröz apeks gibi bölgeler de değerlendirilebilir (10).

Spesifik görüntüleme yöntemlerinden, yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi (High-Resolution Computed Tomography (HRCT)) ve Magnetik Resonans Görüntüleme (MRI), temporal kemik içindeki kolesteatomanın varlığını göstermekte kullanılabilir. HRCT, bazı revizyon ve diğer mastoid operasyonlarının planlanması için tavsiye edilir(1).

Odyometrik Değerlendirme: Odyometrik inceleme genellikle beş farklı durumda karşımıza çıkabilir:

1. Basit perforasyonda genellikle 15 – 20 dB' den fazla işitme kaybı bulunmaz.
2. Ossicular zincirde bir bozukluk varsa bu kayıp 30 – 50 dB arasında değişir.
3. İntakt bir kulak zarının arkasında kemik zincirinin devamlılığı bozulmuş ise bu kayıp 55 – 65 dB arasında değişir.
4. Eğer labirentit meydana getirmişse mikst tip işitme kaybına dönüşebilir.
5. Bazen kolesteatoma büyük bir kitle haline döndüğü halde işitme normal kalabilir. Nedeni kolesteatoma kitlesinin kulak zarı ile oval pencere arasında iletimi sağlamasıdır(33).

Vii- TEDAVİSİ

Primer amaç kolesteatoma epitelinin total eradikasyonudur, fakat her bir vaka için mevcut patolojiye göre uygulanacak cerrahi prosedür değişir. Attik ve timpanik kavitede sınırlı patolojilerde sağlıklı bir mastoidin varlığında sınırlı bir cerrahi yaklaşım uygulanabilir. Oysaki antrum ve mastoidi birlikte tutanlarda radikal bir cerrahi girişim gerekir (34).

Antibiyotiklerin tedavi alanına girmesine kadar otologlar bu hedeflerinden hiç şaşmadılar hatta işitme fonksiyonunu hiç dikkate almadan geniş kaviteler meydana getirdiler. 1950 yılına kadar radikal mastoidektomi otologların tek ve en önemli ameliyat çeşidi olarak kaldı.

1950 yılında iki alman otologu Wullstein ve Zöllner, kronik otitler ve bunların sekelleri yüzünden bozulmuş olan işitmeyi düzeltmeyi amaçlayan bir seri ameliyat çeşitlerini yayınladılar ve bunları timpanoplasti adı altında topladılar. Bu yayın büyük ilgi gördü ve kısa sürede yaygınlaştı. O zamana kadar süren radikal mastoidektomi devri kapandı ve kulak fonksiyonel cerrahisi devri başladı.

Jansen, 1958 yılında, lezyonların temizlenmesinde orta kulağın normal yapısını korumayı önerdi, lezyonlar mastoidektomi yolu ile mastoidden, dış kulak yolu ile orta kulaktan temizleniyor ve aynı zamanda ses iletim zinciri yeniden kuruluyordu. Bu ameliyat çeşidine intakt kanal duvar tekniği adı verildi (9). Amerikada Sheehy ve İrlandada G. Symth bu tekniği geliştiren ve yayan kişilerdir(9).

Cerrahi Teknik:

Bu ameliyata genellikle retroariküler insizyonla başlanır temporal adale fasiasından greft hazırlanır daha sonra mastoid korteks ortaya konur, Yumuşak dokular diseke edilir, çalışma sahamızın üst sınırı olan zigoma kökü ve linea

temporalis ortaya konur ve antrumun mastoid korteksdeki projeksiyonuna uyan ve linea temporalis, Henle dikenini ve dış kulak yolu arka üst duvarı tarafından sınırları oluşturulan Mac even üçgeninde çalışılarak yaklaşık 12 mm derinde olan antruma ulaşılır. Önce semisirküler lateral kanal tanınır (LSSK). LSSK görülmeden diğer bölgelere derinleştirilmez. Sonra orta fossa durası turla izlenir ve dural plate meydana konur. Daha sonra dış kulak yolu arka duvarı inceltilir. Ancak timpanomastoid sütürün altına inilmez. Müteakiben sigmoid sinüs üzerindeki bütün hücreler açılarak sinüsün üzerinde ince bir kemik tabaka bırakılır. Sonra sinüs arkası hücreler açılır. Yukarıdan başlayıp öne ve aşağıya gidildikçe hücreler derinleşir ve apex'le bu derin hücreler arasında seviye farkı meydana gelir, buna digastric ridge denir. Digastric ridgenin 4-6 mm önünden fasial kanal seyrederek bunun daha önüne geçilmemelidir. Daha sonra intersinofasial hücreler açılır. Bundan sonra lateral semisirküler kanalın arkasında kalan interlabirenter hücreler açılır. Apex hücreleri temizlenir ve en spn olarak zigoma kökündeki hücreler kaldırılır. Epiteimaniumdaki enfekte dokular temizlenir. Arkadan inkus görünür hale getirilir. Ancak, turlarken turun inkusa değmemesine dikkat edilmelidir. Aksi halde iç kulak hasarına bağlı sensörinöral işitme kayıpları ortaya çıkabilir. Kolesteatoma varsa inkus çıkarılır. Bunun için önce dış kulak yolundan stapezle olan eklemi ayrılır. Çoğu zaman inkusun uzun kolu erimiş olarak karşımıza çıkar. Arkadan epiteimanium açılır. Kalın burjon dokusu ve kolesteatoma varsa incudo-malleolar eklem bir pikle ayrılır inkus arkadan ayrılır ve turla fossa inkudis açılır. Geniş bir tünelle orta kulağa girilir (10). Kolesteatom ön attığı sarmışsa malleus boynundan kesilir ve başı dışarı alınır. Bütün attik meydana konmuş olur. Enfekte dokular ve kolesteatoma matriksi arkadan öne doğru temizlenir. Fasiyal resesten öne doğru eleve edilir. Lateral yarım daire kanalı üstünden öne ve içe doğru elevasyon sürdürülür. Kemik doku ile ilişkili olup olmadığına bakılmalıdır. Fasiyal kanal sağlamsa kokleariform çıkıntıya kadar elevasyon sürdürülür. Orta kulaktaki lezyonlar, tuba ağzından hipotimpanuma ve yuvarlak pencere kenarına kadar temizlenir. Gene tuba ağzından geriye doğru tensör timpani kası kokleariform çıkıntıya kadar soyulur. Fasiyal resses'deki lezyonlar öne doğru eleve edilir.

Piramidal çıkıntı ortaya çıkarılır. Stapes arkadan öne doğru temizlenir. Sinüs timpaniyi görmek için kolesteatomlu kronik otitlerde piramidal çıkıntı elmas turla alınır dik açılı raspa veya pikle temizlenir. Orta kulak mukozası burjon ve poliple kaplı ise ve yer yer iltihabi granülasyon dokusu gösteriyorsa, yassı epitel varsa tümüyle çıkarılır. Lezyonların temizlenmesinden sonra kemikcik iletim zinciri yeniden kurulur ve greft yapılır.

Altıncı İngiliz akademik konferansında dış kulak yolu arka duvarının korunma durumuna göre intakt kanal ve açık kavite teknikleri tartışılmış ve birbirine göre bu tekniklerin her birinin avantaj ve dezavantajları ortaya konmuştur (34).

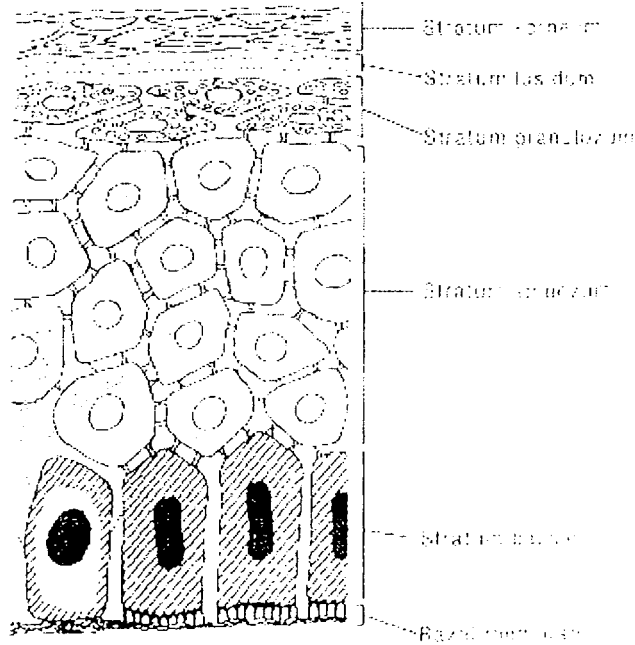
Kanal wall up tekniğinde rekürrens oranı bir hayli fazla bildirilmiş fakat şaşırtıcı olarak Bazı yazarlar intakt kanal ve açık teknikler arasında rekürrens oranı açısından bir fark bulamamıştır (35).

Buna göre her cerrah hastanın durumuna göre uygun cerrahi prosedürü tercih etmelidir. Kolesteatomalarda genellikle rekürrens oranı yaklaşık %10'dur. Günümüzde kabul edilen görüş , eğer kolesteatoma attikte sınırlı , mezotimpanium salim ve orta kulak mukozası salim ise ve dış kulak yolu arka duvarını indirmeden lezyon temizlenebilecekse, seçilecek cerrahi girişim intakt kanal prosedürü olmalıdır. Eğer lezyon mezotimpaniuma ilerlemiş ve hastayı takip imkanımız yoksa seçilecek cerrahi prosedür kanal açık kavite tekniği olmalıdır.

B-DERİ VE HİSTOLOJİSİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER

I-Epidermis: Temel görevlerinden biri kornifikasyon olan epidermis, çok katlı skuamöz bir epitel olup bir yandan şekil ve kalınlığını sürdürürken nispeten hızlı büyür ve diğer yandan da dökülme ile kendi yüzeyini temizler ve dirençli bir yüzey örtüsü ve geçirgenliğe engel olarak hizmet eder.

Epidermis, bazal tabakadan başlayarak spinozum tabakasına doğru gelişir. Granuler tabakada geçirgenlik engelini oluşturur ve dıştaki korneum tabakasından da dökülerek atılır. Epidermis hücrelerinin % 95'i keratinositlerdir. Keratinositler bazal tabakadan deri yüzeyine doğru hareketleri sırasında çok sayıda iyi sınırlı tabakalar oluştururlar. Bu tabakalar; stratum bazale veya germinativum, stratum spinozum, stratum granulozum ve stratum korneumdur. Malpigi tabakaları terimi stratum bazale ve spinozumu kapsar (36), (Şekil 2).

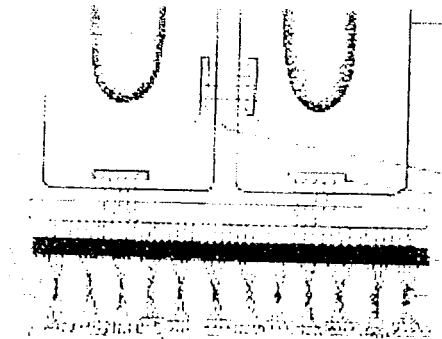


Şekil 2: Derinin katmanları (36)

Epidermis en ince deri yapısıdır. Kalınlığı göz kapaklarında 0.04mm den avuç içlerinde 1.6mm ye kadar varmakla birlikte ortalama kalınlığı 0.1mm dir. Genel olarak epidermis hücrelerinin bazal tabakadan doğduğuna inanılırsa da hücrelerin %30 unun suprabazal olduğu ve bunların mitotik olarak aktif olduğu görülür. Bu hücrelerin bir kısmı aktif olarak proliferer olurken önemli bir kısmı (%60) yavaş bir şekilde proliferer olmaktadır(36).

Stratum bazale, epidermin germinatif tabakasıdır. Bazal tabakayı terkeden hücre, yaklaşık 14 gün içinde stratum korneum a ulaşır, stratum korneum dan geçiş ve deskuame olmak için 14 güne daha gereksinim vardır. Yani atılıncaya kadar geçen süre 28 gündür. Olgunlaşma kolumnar bazal hücrelerin tam keratinize stratum korneum hücreleri haline gelmesinden ibarettir (36).

II-Keratinosit: Keratinositler epidermisteki hücrelerin %80 - %95' ini oluşturan ektodermal kaynaklı hücrelerdir. Tüm keratinositlerin ortak özellikleri sitoplazmalarında keratin ara filamentleri içermeleri ve desmozomlar veya desmozomal bileşmelerle komşu hücrelere bağlanmalarıdır (Şekil 3). Diğer özellikleri epidermis içindeki yerleşim bölgelerine göre farklılık göstermeleridir (36).



Şekil 3: Keratinositlerin yapısını gösteren şekil (36).

Keratinosit ve diğer epitallial hücrelerin belirgin bir unsuru olan keratin filamentleri en basit anlamda hücre içinde iskelet rolü oynarlar. Molekül ağırlıkları 40 – 70 kDa arasında değişen, yaklaşık 30 tane farklı sitokeratin bulunmaktadır. Bu stokeratinlerin her biri ayrı genlerin ürünüdürler. Keratinler başlıca asidik (tip I) ve bazikten nötrale kadar değişen (tip II) alt gruplara bölünebilir. Hücre içi keratin filamentleri molekül ağırlığı birbirine yakın, bir asidik ve bir de bazik keratinin birlikte sunulmasıyla oluşurlar. Bazik keratin, asidik ortağından yaklaşık 8 – 11 kDa daha büyüktür (36).

Bazal tabaka keratinositleri epidermis içinde mitotik aktivite gösteren başlıca hücrelerdir, fakat tüm bazal keratinositler, bölünme potansiyeline sahip değildir. Bazal tabaka içinde epidermal ana hücreler % 10, geçici büyüyen hücreler % 50 ve postmitotik hücreler % 40 oranındadır. Ana hücreler (stem hücre) klon oluşturma özelliğine sahiptir (36).

C-MOLEKÜLER MEKANİZMALAR

I- GENETİK ÇALIŞMA YÖNTEMLERİ

Gen ekspresiyonunu belirleyecek yöntemler hem normal hücrel mekanizmaların anlaşılabilmesi, hem de neoplastik hastalıkların tespiti açısından önemlidir.

Bu yöntemler, bir spesifik genin ekspresiyonunu belirleyecek biyokimyasal veya fenotipik değişiklikleri ortaya çıkarır. Teknolojik ilerlemeler spesifik bir genin ürününün veya protein molekülünün incelememizi mümkün kılmaktadır.

DNA teknolojisinin (Moleküler genetik, moleküler biyoloji, biyoteknoloji) gelişmesi ile herhangi bir genin transkripsiyonal ürününü analiz etmek ve belirlemek mümkündür. Spesifik RNA moleküllerini incelemek için; Insitu Hibridizasyon, Northern Blotting tekniği, Dot veya slot-blotting tekniği, S-1 nuclease incelemesi, RNA'se protection incelemesi ve PCR gibi yöntemler kullanılabilir(37).

Gen ekspresiyonunun kantitatif ölçümü için kullanılan Northern Blotting tekniğinin daha az hassas olması, mikrogram düzeyinde RNA ya gereksinme göstermesi gibi dezavantajları bulunduğundan, PCR tekniği ile kantitatif ölçümü geliştirilmiştir (37).

Bu yöntemlerin pratikte uygulanabilmesi, ileri teknoloji ve önemli bir mali külfet gerektirmektedir. İleri teknolojinin uygulanabildiği, fakat mali külfetlerin aşamadığı ülkemiz şartlarında yukarıda sözü geçen tekniklerin çalışmamızda kullanılması mümkün olmamıştır. Bu nedenle, maliyeti daha az ve günümüzde geçerliliğini halen korumakta olan immunohistokimyasal yöntemler kullanılmıştır.

Immunohistokimyasal yöntemlerin temeli, antijen antikor ilişkisine dayanır. Belli bir hücresel yapıya karşı, bu yapıya spesifik mono veya poliklonal antikorlar hedeflendirilir. Antikor ve antijenin birleşmesi sonrasında, tespit etmek istediğimiz yapı histolojik olarak fark edilebilir(37).

II-APOPİTOSİS

Programlanmış hücre ölümü anlamına gelir. Nekrozdan iki temel nokta ile ayrılır:

1-Çekirdeğin yapısal organizasyonunun bozulması.

2-DNA parçalarının bir merdiven şeklinde bazı hücrelerde biyokimyasal olarak belirlenmesidir. DNA'daki fragmantasyon, endojen endo nükleazlar aracılığı ile katalize edilir. Apoptosis, elektron mikroskopi, flow cytometry, immunohistokimyasal boyama teknikleri, ELİSA ve moleküller teknikler aracılığı ile gösterilebilir (37).

III-P53 GENİ

Şimdiye kadar, kanser ile ilişkisi olan yüzün üzerinde gen belirlenmiştir. Bunlardan bir çoğunda gen dizisinde ortaya çıkan mutasyonlar saptanmıştır. Tümör baskılayıcı genler bu genlerden bir bölümü olup P53 geni de bunlardan biridir. Tümör baskılayıcı genler DNA hasarına duyarlı noktalardır çünkü normal olarak bunlar organizmada fizyolojik bariyer olarak görev yapar. Aynı zamanda onkogenler ile ortaya çıkan ve kontrol altına alınamayan hücre proliferasyonuna yol açan büyüme ve metastazı dolaylı olarak kontrol altında tutarlar. Tümör baskılayıcı fonksiyonunun kaybı, genomda oluşacak bir hasar sonucu ortaya çıkar (37).

Tümör baskılayıcı genler arasında en iyi çalışılmış olanı P53 genidir. P53 geni 1970'lerin sonlarına doğru bulunmuştur. 17. kromozomun kısa (P) kolunda lokalizedir (38,39) ve yarılanma zamanı yaklaşık olarak 20 dk.dir. Bu gen hücre

proliferasyonunun kontrolünde rol oynayan 53 kd'luk bir nükleer fosfoproteini kodlamaktadır. Memeli fosfoprotein P53 ün hücre siklusunda gerekli olduğu ve hücre bölünmesinde yaşamsal öneme sahip olduğu bilinmektedir. DNA tamiri, DNA sentezi, hücre farklılaşması ve programlanmış hücre ölümünde (apoptosis) görev alır(40).

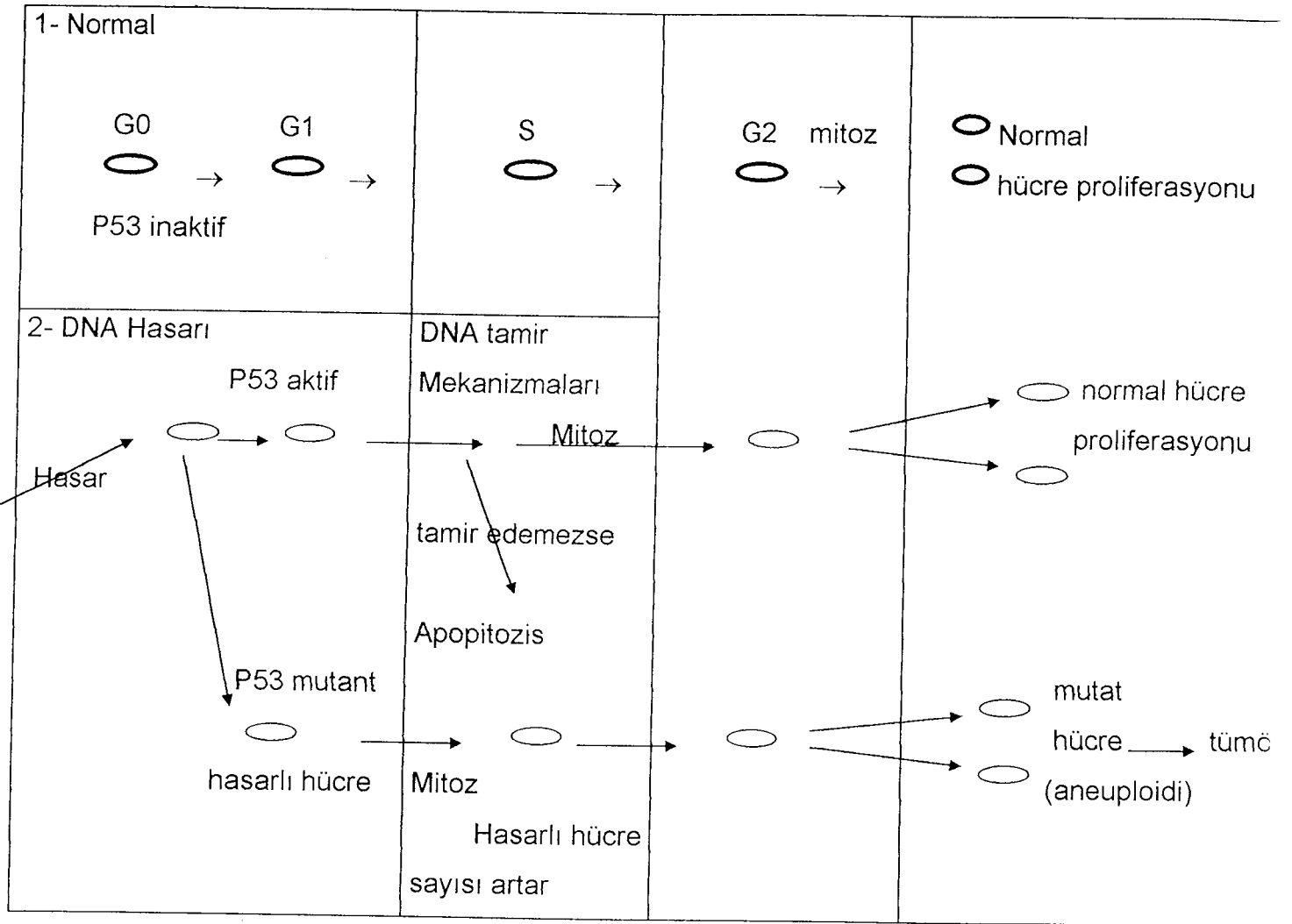
P53 protein geninin toplam 11 eksonu bulunmaktadır ve bu eksonlar 393 aminoasidi kodlamaktadırlar. Bu gen dizisinde en sık ortaya çıkan değişiklikler, özellikle genin 5-8 eksonlarında olmaktadır. P53 genindeki akkiz mutasyonlar en sık görülen tümör spesifik genetik değişikliklerdir. Osteosarkom, meningiom, hepatosellüler karsinom, Burkitt lenfoma, myelodisplastik sendrom, kolon, akciğer, mide ve over gibi bir çok kanser tipinde yayınlanmıştır. Bunların yanı sıra, nadir bir ailevi kanser sendromu olan Li Fraumeni sendromunda P53 genine özgü mutasyonlar tanımlanmıştır. P53 geninde tanımlanan mutasyonlar ağırlıklı olarak nokta mutasyonları olup, delasyon ve insersiyon şeklinde olanlar daha nadirdir (37,41).

Normal olarak P53 proteini hücre siklusunu düzenlemek üzere DNA molekülüne bağlanmaktadır. Diğer tümör süpresör genlerine (RB1,WT1,TP53,NF1,DCC gibi) ilişkin proteinlerinde benzer roller üstlendiği sanılmaktadır ve bu nedenle böyle proteinlerin yokluğu kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olmaktadır (42).

Kısaca, P53 gen mutasyonu pek çok neoplazide tesbit edilmiştir. Nonmutant, yani vahşi p53 geninin ürünü, esas olarak hücrelerin büyümesini engelleyen multifonksiyonel bir proteindir. Bu protein, hücre diferansiasyonunu etkiler ve gen transkripsiyonunu düzenler. Albino ve arkadaşları (7) tarafından rapor edildiği gibi, hücre bölünmesi ve hücre ölümü arasındaki sıkı kontrolü sağlar. Bu kontrol bütün doku tiplerinde P53 tarafından sağlanır. Bununla beraber P53 proteini keratinosit

proliferasyonunda, hücre siklus kontrolünde, apoptozisde ve hatta neoplastik transformasyonda önemli rol oynar (37,43).

Normalde P53 inaktifken hücre G₀ fazından G₁ fazına ve daha sonra S fazından G₂ fazına geçerek mitozaya girer. DNA hasarı olduğu zaman iki farklı durum gözlenir; P53 aktif hale geçerek hücre siklusunu durdurur ve DNA tamiri için hücreye zaman kazandırır. Eğer hücre DNA tamirini başarırsa normal mitozaya girer ve normal hücre proliferasyonu gerçekleşir. Eğer hücre DNA tamirini başaramazsa apoptozis gerçekleşir (Tablo 2). Eğer p53 geninde bir mutasyon varsa, hücre hasarlı DNA'yı tamir için zaman kazanamaz veya apoptozise gidemez. Bu durumda, hasarlı hücre S fazına geçer ve direkt mitozaya girer ve tümör hücresinde olduğu gibi hasarlı hücre proliferasyonu gerçekleşir. Bunun sonucu ise neoplastik bir transformasyondur (40,44).



Tablo 2. P53 geninin fonksiyonel şeması (44).

MATERYAL ve METOD

Çalışmamıza, 1996-2000 yılları arasında kronik otitis media tanısıyla opere edilen toplam 39 hasta dahil edildi. Otuz dokuz hastanın, 28'inde tanı kolesteatoma olurken, 11'inde kolesteatomsuz kronik otitis mediaydı. Hastaların yaşları 12 ila 61 arasında değişmekteydi. Hastaların 13'sinde sekonder akkiz kolesteatoma, 15'inde primer akkiz kolesteatoma mevcuttu. Onsekiz hastaya radikal mastoidektomi, 11 hastaya mastoidektomili timpanoplasti, 9 hastaya açık kavite timpanoplasti ve 1 hastaya revizyon timpanoplasti operasyonu yapıldı.

Otuz dokuz hastanın, 28'inden kolesteatoma matrixleri ve 11'inden ise dış kulak yolu derileri cerrahi müdahale sırasında alındı. Bu biyopsi materyalleri %10' luk formaldehit içerisinde muhafaza edildi. Kolesteatom matrixleri çalışma grubu, dış kulak yolu derileri ise kontrol grubu olarak kabul edildi. Biopsi materyalleri histopatolojik ve immunohistokimyasal inceleme yapılmak üzere patoloji laboratuvarına gönderildi.

P53'ün immunohistokimyasal tespiti: %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edilmiş spesmenler parafin bloklara gömüldükten sonra 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Adhezidif lamlara alınan kesitler alkol ve xylol solüsyonlarından geçirildikten sonra fırınlama işlemine geçirildi. Kesitler mikrodalga fırında yüksek ısıda antijen - retrieval solüsyonu içinde 5 dk olmak üzere üç kez işleme tabi tutulduktan sonra immunohistokimyasal boyama işlemine başlandı. Boyama işleminde anti - P53 monoklonal antikoru (Biogenex, AM195 – 5M) kullanılarak kesitlerin immunohistokimyasal boyamaları yapıldı. Bu amaçla Streptavidin – Biotin, Horseradish metodu (DAKO, LSAB 2, K 0695) kullanıldı.

P53 antikoru 30 dakika süreyle lamlar üzerindeki doku kesitlerine, dokuyu tamamen kaplayacak şekilde damlatıldı ve fosfat tamponuyla yıkandı. Daha sonra link solüsyonu ve label solüsyonu ile işlem den geçirildi. On dakika süreyle kromojen ile reaksiyona sokuldu ve karşıt boya olarak Hlarris hemotoksilen kullanıldı. Boyanan preparatlar alkol ve xylol'den geçirilerek berraklaşması sağlandı. Preparatlar balzam ile kapatıldıktan sonra değerlendirme işlemine geçildi.

Preparatlarda, P53 pozitif nükleer boyanmanın yoğun olduğu alanlar seçildi. Dört yüz büyütme altında 1000 hücre sayıldı. P53 pozitif hücreler sayıldı. %1–5 arası pozitif boyanma bir pozitif, %6–10 boyanma iki pozitif, %10'dan fazla boyanma üç pozitif olarak kabul edildi. Hiç boyanma olmaması p53 negatifliği kabul edildi. Aynı zamanda, 1000 hücre arasındaki p53 pozitif olanların sayısal değeri de tespit edildi.

İstatistik: Elde edilen bulguların istatistiki olarak anlamlılığı PC'de Windows yazılımı altında, SPSS 8.0 programı kullanılarak incelendi. Ki kare ve Mann – Whitney U istatistik testleri kullanıldı.

Kontrol ve çalışma grubundaki p53 pozitifliği her iki test de kullanılarak karşılaştırıldı. Primer ve sekonder akkiz kolesteatomalarda, p53 pozitifliği açısından istatistiksel bir fark olup olmadığı ki kare testi kullanılarak incelendi. Hastalar cinsiyetlerine göre sınıflandırılarak, p53 pozitifliği ile hastanın cinsiyeti arasındaki ilişki incelendi.

BULGULAR

Yirmi sekiz kolesteatoma matriksinin 15'inde (%53.57) p53 pozitifliği tespit edildi. Bunların 10'unda bir pozitif (%35.71), 3'ünde iki pozitif (%10.71) ve 2' sinde üç pozitif (%7.14). Kontrol derilerde p53 pozitifliği 3 vakada (%27.27) tespit edildi. Bunların da 2'sinde bir pozitif (%18.18), 1'inde üç pozitif (%9.09). Her iki grup arasında p53 pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (ki kare, $p>0.05$), (Tablo 3).

Kolesteatomlarda ortalama p53 pozitif hücre sayısı 19.6 ± 4.3 bulunurken, deri kontrollerde bu sayı 11.4 ± 7.1 bulunmuştur. P53 pozitif hücre sayıları açısından karşılaştırıldığında, her iki grup arasında yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (Mann Whitney U test, $z = -1.349$, $p = 0.2$).

Kontrol ve çalışma grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı Mann-Whitney U yöntemi kullanılarak incelendi ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. ($z = -1.349$, $p = 0.2$), (Tablo 3).

Tablo 3: Çalışma ve kontrol grubundaki P53 immunohistokimya sonuçları.

P53 immunohistokimyası	Çalışma Grubu No. hasta (%)	Kontrol Grubu No.hasta (%)	Toplam No. Hasta (%)
Pozitif	15 (53.57)	3 (27.27)	18 (46.153)
Negatif	13 (46.42)	8 (72.72)	21 (53.84)
Toplam	28 (71.79)	11(28.21)	39 (100)

Onbeş primer akkiz kolesteatomanın 10'unda (%66.6) p53 pozitif bulunurken, 65'inde (%33.4) p53 negatif olarak tespit edildi. Onüç sekonder akkiz kolesteatoma spesmeninin 5'inde (%38.46) p53 pozitif bulunurken, 8'inde (%61.54) p53 negatif bulundu. Primer ve sekonder akkiz kolesteatomlar p53 pozitifliği açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. (ki kare=3.2, $p>0.05$), (tablo 4).

Tablo-4. Primer ve sekonder kolesteatomlardaki P53 immunohistokimya sonuçları.

P53 immunohistokimyası	Primer akkiz kolesteatoma No. Hasta (%)	Sekonder akkiz Kolesteatoma No. hasta (%)	Toplam No. hasta (%)
Pozitif	10 (66.67)	5 (38,46)	15 (53.6)
Negatif	5 (33.33)	8 (61,54)	13 (46.4)
Toplam	15 (100)	13 (100)	28 (100)

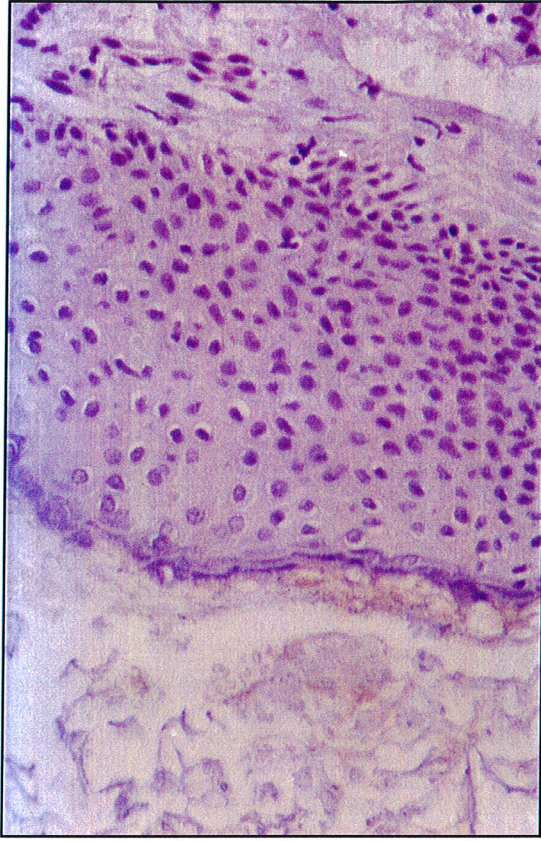
Kadın hastaların %43.75'inde p53 pozitifliği tespit edilirken, erkek hastaların % 66.6'sında p53 pozitif bulundu. Kolesteatom vakalarında, hastaların cinsiyetine göre p53 pozitifliği incelendiğinde, arada anlamlı bir fark olduğu görüldü (ki kare15.77, $p<0.01$), (tablo 5).

Tablo-5. P53 immunohistokimyasının cinsiyete göre değişimi.

P53 immunohistokimyası	Kadın No. Hasta (%)	Erkek No. Hasta (%)	Toplam No. Hasta (%)
Pozitif	7 (43.75)	8 (66.6)	15 (53.57)
Negatif	9 (56.25)	4 (33.3)	13 (44.42)
Toplam	16 (100)	12 (100)	28 (100)

Çalışmamızda kolesteatoma doku spesmenlerinin yapılan immünohistokimyasal incelemesi sonucunda P53 pozitif boyanmanın özellikle

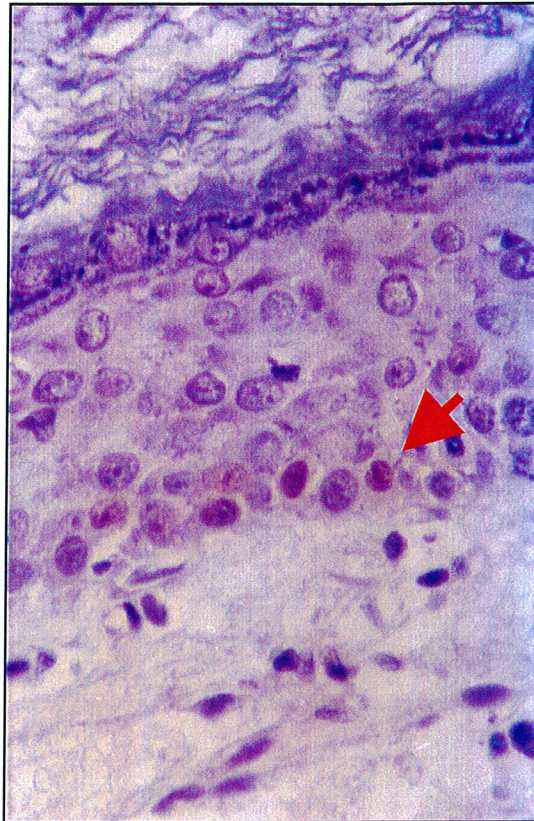
epiderminin bazal ve suprabazal tabakalarında daha yoğun olduğu, buna karşın kontrol dış kulak yolu deri spesmenlerinde P53 pozitif boyanmanın daha çok epiderminin bazal tabakasında daha yoğun olduğu gözlemlendi.(Resim:1-5)



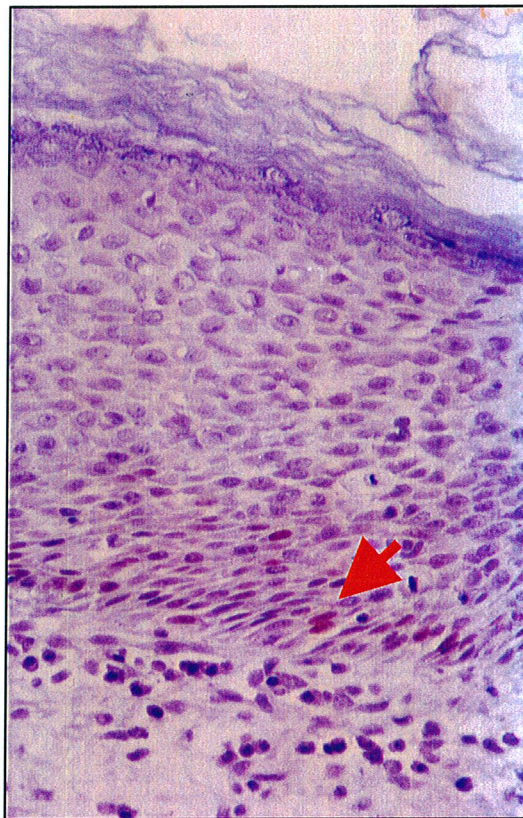
Resim 1. Kolestomatada olgusunda
çok katlı yassı epitelde P53(-)
boyanma (immünohistokimyaX100)



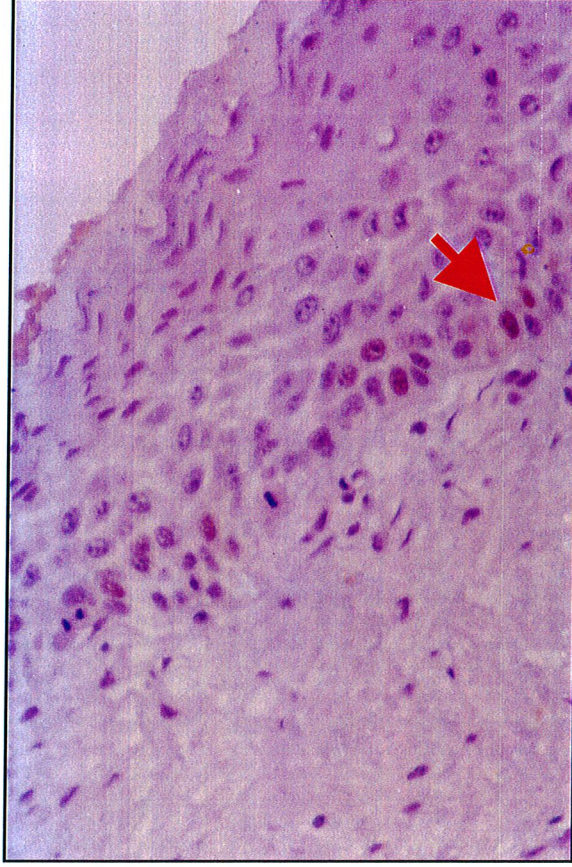
Resim 2. Kolestomatada olgusunda
bazal membranda P53(+)nükleer
boyanma (immünohistokimyaX400)



Resim 3. Kolesteatoma olgusunda bazal membranda P53(+) nükleer boyanma (immünohistokimyaX400)



Resim 4. Kolesteatoma olgusunda Stratum Spinozum ve Stratum Bazale'de P53(+) nükleer boyanma (immünohistokimyaX100)



Resim 5. Kolesteatoma olgusunda bazal membranda P53 (+)nükleer boyanma (immünohistokimya x 200)

TARTIŞMA

Normal dokularda hücre ölümü ve hücre proliferasyonu arasında bir denge mevcuttur. Neoplazilerde bu denge bozulmakta ve hücre proliferasyonunda kontrolsüz bir artış ortaya çıkmaktadır. Deride de hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasında bir denge mevcuttur. Benzer şekilde, bu dengenin bozulması hastalıklara sebep olur. Hücre proliferasyonu ve ölümü genetik mekanizmalarla kontrol edilir. Bu olaylarda rol oynayan çeşitli genler vardır. Bu genlerden biri de, bir tümör supresor gen olan p53 genidir.

P53 geni keratinositlerin proliferasyonunda, diferansiyasyonunda ve apoptozisde rol oynar. P53'ün primer rolü hücre iç ve dış genotoksik ajanlara maruz kaldığı zaman, bozuk DNA'nın transkripsiyonunu ve replikasyonunu durdurarak mutant hücre oluşumunu engellemektir. P53 bu işlevi P21WAF1 ve GADD45 ve mdm2 gibi diğer genlerle işbirliği yaparak yerine getirir (7). Hücre hasarı olduğunda, hücreye DNA tamiri için zaman kazandırmak amacıyla hücre siklusunu durdurur ve hücrenin DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Hücrede DNA tamiri başarılı olamazsa, p53 hasarlı hücreyi apoptosise götürür. Eğer p53 geni mutant ise, hasarlı hücre mitozaya girer ve kontrolsüz hücre proliferasyonu gerçekleşir. Bundan dolayı, neoplazilerde p53 mutasyonunu ile kontrolsüz hücre proliferasyonu arasında ilişki olabileceği düşünülerek muhtelif çalışmalar yapılmıştır (41). Örneğin, Hipofarinks ve ösefagusun primer malign neoplazmlarında yüksek p53 ekspresyonu olduğu tespit edilmiştir (45).

P53 proteininin mutasyonu sonucu p53 genellikle fonksiyonunu kaybeder ve mutant p53 seviyesi artar. Mutant olmayan, vahsi tip p53'ü tespit etmek çok kolay değildir. Yüksek maliyet gerektiren moleküler teknikler kullanmak gerekir. Diğer taraftan, mutant p53 geninin proteinini tespit etmek daha kolay ve ucuzdur. Bu nedenle diğer çalışmalarda olduğu gibi (7), biz de çalışmamızda mutant P53 geninin

proteinini immunohistokimyasal yöntemler kullanarak tespit ettik. Bunu yapmak araştırma maliyetini oldukça düşürdü.

P53 proteini; keratinosit diferansiasyonu, apoptosiz ve hücre proliferasyonunda rol oynar. Nitekim bu durum, 1995 yılında yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (46). Yine 1998 yılında Kojima ve arkadaşlarının (2) yaptığı ve orta kulak kolesteatomalarında hücre proliferasyonu ve apoptosiz konulu çalışmada kolesteatomada apoptosiz ve hücre proliferasyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte kolesteatoma dokusundaki bu hiperproliferatif durumun mekanizması hala bilinmemektedir. Ancak, yapılan başka bir çalışmada stratum korniumun yenilenme zamanı, dancylclorid uptake'i kullanılarak ölçülmüş ve kontrol grubu ile kolesteatoma arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (47). Önceki çalışmalarda normal dış kulak yolu derisinde epidermal growth faktör reseptör messenger RNA'sının yalnızca bazal tabakada lokalize olduğu, buna karşılık kolesteatomanın bütün tabakalarında yüksek olduğu gösterilmiştir (5). Aynı zamanda proliferasyondan sorumlu Ki-67' nin de yüksekliği gösterilmiş ve yine proliferasyonla giden hastalıklar olan psoriasis, solar keratosis ve yassı hücreli karsinom gibi deri hastalıklarında yüksek olan CK16' nin kolesteatoma dokusunda da yüksek olduğu gösterilmiştir (4). Yine kolesteatomada p53 protein yüksekliği olduğu iddia edilmiştir(7). Bütün bu bulgular göstermektedir ki, kolesteatoma dokusunun hiperproliferatif karakterine birçok faktör etki etmektedir.

Kolesteatomada p53 geninde mutasyon olası değildir. Çünkü: bu lezyondan açık bir neoplaziye ilerleme nadirdir (7). 1991 yılında Almanya'da yapılan bir çalışmada kolesteatomada DNA çalışması yapmışlar ve bu amaçla 13 kolesteatoma spesmeni üzerinde çalışarak 13 vakanın 9'unda aneuploidi bulmuşlardır (48). Bunun yanında Desloge ve arkadaşları ise (49). kolesteatomanın low grade neoplazi olabileceği iddiasıyla 10 kolesteatoma spesmeni ile 8 postariküler deride yaptıkları çalışmada sadece 1 DNA'da aneuploidi bulmuşlar, geri kalan 9 kolesteatoma

spesmeninde ve 8 postariküler deri spesmeninde normal euploidi saptamışlar ve böylece kolesteatomanın low grade neoplazi olamayacağını rapor etmişlerdir. Kojima ve arkadaşları (2), tarafından yapılan bir çalışmada 10 kolesteatoma spesmeni ve 6 postariküler deri, immünohistokimyasal olarak hücre proliferasyonu yönünden karşılaştırılmış ve kolesteatomada hücre proliferasyonu olduğu ancak neoplazilerde olduğu gibi bu proliferasyonun kontrolsüz olmadığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, P53 proteinini kolestatomanın prickle cell tabakasında yüksek oranda bulmuşlar ve P53 proteininin hücre regülasyonunda ve apoptotik hücre ölümünde rol oynadığını göstermişlerdir. Ancak kolesteatomanın prickle cell tabakasında P53 proteininin yüksekliğinin apoptotik hücre ölümüne katkıda bulunduğu konusunda daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir (2).

P53 proteini apoptosizde olduğu gibi keratinosit proliferasyonunda da önemli bir rol oynar. Kolesteatomayı oluşturan keratinositlerdeki moleküller ve biyolojik defektler henüz tam manasıyla bilinmemektedir (50). Önceki yapılan çeşitli çalışmalarda kolesteatoma dokusu normal deri ile karşılaştırılmış ve kolesteatoma bazal ve subrabazal tabakada hücre proliferasyon markırı olan CK16 nın yüksek seviyede olduğu tesbit edilmiştir. Fakat aynı çalışmalarda, p53 geni çalışılmamıştır (3).

Deri skuamöz hücre karsinomalarında P53 geninde %50 den fazla mutasyon olduğu, bu mutasyonların genellikle nokta mutasyonlar olduğu, mutasyonlar ile kötü prognoz arasında ilişki olduğu gösterilmiş ve bu durumun da mutant P53 genine bağlı apoptosis yokluğuna bağlı olabileceği iddia edilmiştir (41). Yine Lassaletta ve arkadaşları (51), tarafından yapılan bir çalışmada, farinksin ileri evre yassı hücreli karsinomlarında, kemoterapiye cevap ve nüks oranları karşılaştırılmış ve sonuçta kemoterapiye cevap oranının P53 negatif grupta daha yüksek olduğu ve yine nüksün P53 negatif grupta daha düşük olduğu gösterilmiştir. Buradan yola çıkarak P53 gen değişikliği ile kolesteatomanın cerrahi sonrası nüksü arasında ilişki olup olmadığı

şeklinde bir soru akla gelebilir. Bizim yaptığımız çalışmada, nüks kolesteatoma vakalarının sayısı yeterli olmadığından bu soruya cevap vermek mümkün olmadı. Yapılan önceki çalışmalarda da, diferansiasyon markırı olan sarcolectin ve calcyclin'e karşı monoklonal antikolar kullanılarak, kolesteatomada apopitotik hücre ölümünün yüksekliği gösterilmiş, fakat nüks ve primer kolesteatomalar arasında bir fark olup olmadığı belirtilmemiştir. Kolesteatomada eğer apopitotik hücre ölümü yüksekse, bu durum vahşi tip p53'ün yüksek olmasına bağlanabilir. Ancak bizim yaptığımız çalışmada p53 pozitifliği açısından çalışma ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Bu durum bize, p53'ün kolesteatom etiyojisinde önemli bir rolü olmadığını ve p53 ile ilgili hücresel kontrol mekanizmalarının kolesteatomada bozulmadığını göstermiştir. Bu konuda kesin cevap için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

P53 proteininin özelliklerinden biri, hücreye zarar veren ekstrinsik ve intrinsik bir etki geldiği zaman hücre siklusunu durdurup hücreye DNA tamiri için zaman kazandırmak ve eğer hücre kendini yenilemeyi başırırsa bölünmesine izin vermek, başaramazsa hücreyi apopitozise göndermektir (44). Fakat çalışmamızın sonuçlarına göre, normal deri ile karşılaştırıldığı zaman kolesteatomalarda, apopitotik hücre oranlarında belirgin bir yükseklik gözlenmemiştir.

Bir çok çalışmada kolesteatomanın karakteristik özelliği olarak aşırı hücre proliferasyonu gözlenmiştir. Kolesteatomada keratinosit proliferasyonunu arttıran faktörler ekstrinsik de olabilir. Örneğin; bakteri antijenleri, cytokinler, inflamatuvar mediatörler, yalnız başına veya kombinasyon halinde koordinasyonsuz hücre proliferasyonu için gerekli uyarıyı sağlayabilir. Kolesteatoma patolojisi, host inflamatuvar hücreler tarafından sekrete edilen infamatuar cytokininlerin fazlalığı ve bakterilerin varlığı ile izah edilebilir (50).

Albino ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptıkları bir çalışmada (7), primer akkiz kolesteatomada % 20.1 ve sekonder akkiz kolesteatomada ise % 9.3 oranında p53 pozitifliği bulunmuştur. Fakat, kolesteatomanın alt tipleri arasındaki bu farklılığın nedeni anlaşılamamıştır. Bizim yaptığımız çalışmada, kolesteatoma spesmenlerinin çoğunda, p53 pozitif boyanması en sık epidermisin bazal ve subrabazal tabakalarında mevcut iken, kontrol grubunda p53 pozitif boyanma sadece bazal tabakada mevcut idi. Oysa ki Albino ve arkadaşlarının (7), yaptığı çalışmada, normal deride P53 pozitif boyanması esas olarak bazal tabakada ve az sayıdaki vakada ise spinöz tabakada olmuştur. Bununla birlikte, kolesteatomanın bütün tabakalarında P53 pozitifliği bulmuşlardır. Ancak, bizim bulgularımızla uyumlu olarak bazal tabakada daha yoğun boyanma olduğu da gösterilmiştir. Ayrıca Shinoda ve Huang (46), p53 proteininin kolesteatomanın granüler tabakasındaki keratinositlerde yoğun olarak bulunduğunu göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada, kolesteatomanın granüler tabakasındaki nükleuslarda p53 proteininin varlığı gösterilmiştir. Keratinositlerin nükleusunda mevcut olan ve muhtemelen interleukin ve tümör nekrosis faktör alfa gibi inflamatuvar sitokinler tarafından indüklenen HSP70 (Heat shock proteins) gibi proteinlerin kompleks yapılar oluşturması sonucu, p53 protein birikiminin arttığı gösterilmiştir (52). Genel olarak epidermis hücrelerinin bazal tabakadan menşei aldığı görüşü hakimse de, bu hücrelerin % 30'u suprabazal tabakadan menşei alır(19). Bazal ve suprabazal tabakada mitotik aktivitenin yoğun olması p53 geninde mutasyon olma ihtimalini arttırabilir. Böylece oluşan mutant p53'ün süpresör etkisinin ortadan kalkması hücre siklusunu etkileyebilir. Fakat çalışmamızda, kolesteatoma doku spesmeni ve kontrol grubu arasında rakamsal olarak fark bulunmasına rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum bize kolesteatoma patogenezinde P53 geninin önemli bir role sahip olmadığını göstermektedir.

Albino ve arkadaşları (7), kolesteatoma epitelinin davranışının bir neoplaziden çok bir yara iyileşmesi sürecine daha çok benzediğini bildirmişlerdir. Ayrıca bütün malign lezyonların kritik özelliği olan genetik instabilitenin varlığı kolesteatomada

gösterilememiştir. Yine aynı çalışmada kolesteatomanın çeşitli tipleri arasında (primer ve sekonder akkiz, rekkürren ve konjenital) bariz moleküler ve hücresel herhangi bir fark olmadığı gösterilmiştir. Bu moleküler ve hücresel disfonksiyonun taslağının çıkarılması ile kolesteatomanın patogenezi ve tedavisinde bu bilgilerin nasıl kullanılacağı hakkında daha ileri çalışmalar yapılabilir.

Kojima ve arkadaşları (2), tarafından yapılan araştırmada proliferatif hücre nükleer antijene(PCNA) karşı monoklonal antikolar kullanılarak yapılan immünohistokimyasal analiz ile normal dış kulak yolu derisinin bazal ve suprabazal tabakalarında proliferatif hücrelerin varlığı gösterilmiştir. Oysa, kolesteatomada PCNA pozitifliği prickle ve granüler hücre tabakasında gösterilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada, mutant P53 pozitif boyanmanın bazal ve suprabazal tabakalarda daha yoğun olduğu gösterildi. Hücre çoğalmasının yoğun olduğu bazal tabakada P53 çokluğu olması, kolesteatoma patolojisinde P53'ün rolü olabileceğini düşündürmekle birlikte, çalışma ve kontrol grubu arasında rakamsal fark olmasına karşın bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmaması bize kolesteatomanın etyopatogenezisinde P53'ün rolü olmadığı sonucuna götürmektedir.

Çalışmamızda sekonder ve primer kolesteatomalar P53 pozitif ve negatifliği yönünden cinsiyetlerine göre incelendi ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu bulundu. Bunun nedenini tam olarak izah edememiş olmakla birlikte, bu farkın hormonal nedenlere bağlı olabileceği düşünülebilir. Buradan yola çıkarak kolesteatomanın etyopatogenezisinde hormonal bir etyolojide akla gelir. Fakat, konuyla ilgili herhangi bir literatür verisi olmaması, cinsiyetle kolesteatoma ilişkisini tam olarak bağdaştırmamıza engel oldu. Bu nedenle, yapılacak ileri çalışmalar konunun açıklık kazanmasına yardımcı olabilir.

SONUÇ

Bizim yaptığımız çalışmada kolesteatoma doku spesmeni ve kontrol grubu olarak normal dış kulak yolu derisi alındı. Kolesteatomada P53 pozitif boyanmanın daha çok kolesteatoma epidermisinin bazal ve suprabazal tabakasında yoğun iken kontrol grubunda yalnızca bazal tabakada yoğun olduğu bulundu. Fakat istatistiksel olarak bu fark anlamlı bulunmadı. Daha sonra sekonder akkiz ve primer akkiz kolesteatoma arasında P53 pozitif boyanma yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı incelendi ve anlamlı fark olmadığı görüldü. Fakat çalışma ve kontrol grubu arasında hastaların cinsiyetlerine göre P53 pozitif boyanma yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu

Sonuç olarak kolesteatomanın etyopatogenezinde P53 geninin önemli bir role sahip olmadığı ancak cinsiyetlere göre çalışma ve kontrol grubu arasında istatiki olarak anlamlı fark bulunması kolesteatoma etyopatogenezinde hormonal nedenlerin rolü olabileceğini düşündürmektedir. P53 pozitif boyanmanın kolesteatomlu olgularda daha çok bazal ve suprabazal tabakada yoğun olması bu katların proliferatif aktivitesine bağlanabilir. Bununla birlikte bizim yaptığımız çalışma ilerde bu konuda yapılabilecek çalışmalara öncülük etmesi açısından önemlidir.

ÖZET

Günümüzde hala önemli bir otolojik problem olmaya devam eden kolesteatomların etyolojisi karanlıktır ve bu konuda yoğun çalışmalar devam etmektedir. Kolesteatomanın etyopatogenezi aydınlatmak amacıyla, hücrenin proliferasyon fazında rol alan P53 tümör süpresör geninin kolesteatoma oluşumundaki önemi araştırıldı.

Yaşları 12 ila 61 arasında değişen ve yaş ortalaması 36 olan 24'ü kadın toplam 39 olgu çalışmaya dahil edildi. Vakaların 15 tanesi primer, 13 tanesi sekonder kolesteatoma idi. Bu çalışmamızda 28 kolesteatoma spesmeni ve kolesteatomsuz kronik otit cerrahisi sırasında alınan 11 dış kulak yolu derisi spesmeni kontrol grubu olarak kullanıldı.

Konvansiyonal histopatoloji sonrası İmmünohistokimyasal çalışma yapıldı. P53 tümör süpresör geninin tesbiti için anti P53 (Biogenex, AM 195-) monoklonal antikoru kullanıldı. Çalışmada Streptavidin-Biotin, Horseradish metodu uygulandı.

P53 pozitifliği 17 vakada (%43.58) tesbit edildi. Daha sonra sekonder ve primer kolesteatomada P53 pozitifliği ve negatifliği yönünden araştırıldı ve buna göre 15 primer kolesteatomanın 10'unda (%66,67) P53 pozitif, 5'inde (%33,33) P53 negatif ve 13 sekonder kolesteatoma spesmeninin 5' inde (%38,46) P53 pozitif, 8' inde (%61,54) P53 negatif olarak tesbit edildi. Bu sonuçlar Ki kare testi ile incelendi ve primer ve sekonder kolesteatoma arasında P53 pozitifliği ve negatifliği yönünden anlamlı fark olmadığı bulundu. (kontrol grubu $X^2=15.77P<0.001$, çalışma grubu $X^2=21.704P<0.001$).

Kontrol ve çalışma grubu arasında P53 pozitifliği ve negatifliği yönünden istatistiki olarak anlamlı bir fark olup olmadığı Mann-Whitney U yöntemi kullanılarak incelendi ve aralarında istatistiki olarak anlamlı fark olmadığı görüldü. ($Z = -1,349$, $p= 0.233$, kontrol ortalama ($n=11$) = 11.4 ± 7.1 , çalışma ortalama (28) = 19.6 ± 4.3).

Yine hastalar p53 pozitif ve negatifliği yönünden cinsiyetlerine göre incelendi ve buna göre kontrol ve çalışma grubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark olduğu bulundu ($X^2 = 3.02$ $P=0.388$ Kontrol $X^2 = 13.272<0.001$, çalışma grubu $X^2 = 21.401P<$). Bu sonuç, hormonal faktörlerin kolesteatoma etyolojisinde yerlabileceğini düşündürdü.

Kolesteatoma spesmenlerinin yapılan immunohistokimyasal incelemesi sonucunda P53 pozitif boyanmanın özellikle epidermisin bazal ve suprabazal tabakasında yoğun olduğu buna karşılık normal dış kulak yolu deri spesmenlerinde P53 pozitif boyanmanın daha çok epidermisin bazal tabakasında yoğun olarak bulunduğu saptandı.

Sonuç olarak bu çalışmada kolesteatoma ve kontrol grubu olarak çalışılan dış kulak yolu derisi arasında P53 pozitifliği yönünden istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamadı, ancak P53 pozitif boyanmanın kolesteatoma doku spesmenlerinde daha çok bazal ve suprabazal tabakada yoğun olması bu katmanların proliferatif aktivitesi ile ilişkisini düşündürmektedir. Ayrıca cinsiyetler arasında bulunan anlamlı fark hormonal etyolojiyi akla getirebilir.

SUMMARY

The etiology of cholesteatoma, which has been an important otologic problem, is unclear to date, and has been searched. In this study, p53 tumor suppressor gene, functional in the cell proliferation, was investigated in cholesteatoma in an effort to understand its role in cholesteatoma etiopathogenesis.

Thirty nine patients with ages ranging between 12 and 61 (mean 36) years, and of whom 24 were females and 15 were males, were included in the study. Twenty eight patients had cholesteatoma and 11 had chronic otitis media. Of 24 cholesteatoma cases, 15 had primary acquired and 13 had secondary acquired cholesteatoma. Biopsy samples were taken from the cholesteatoma matrix and the skin of external auditory canal in 28 cholesteatoma and 11 chronic otitis media patients, respectively. The cholesteatoma matrix biopsies constituted the study group while the meatal skin biopsies were considered controls.

Conventional histopathologic examination was performed preceding the immunohistochemical assessment in which anti-p53 monoclonal antibody (Biogenex, AM 195-) was used for the immunodetection of p53 tumor suppressor gene. Streptavidin-Biotin, Horseradish method was used in the study.

p53 positivity was detected in 17 of 28 (43.6%) cholesteatoma cases. The mean number of p53 positive cells were 11.4 ± 7.1 and 19.6 ± 4.3 in the control and study groups, respectively. The results of p53 immunohistochemistry were not different significantly between the study and control groups ($p > 0.05$).

p53 results were compared in the primary and secondary acquired cholesteatomas. Of 15 primary acquired cholesteatoma, 10 (66.7%) were p53 positive and 5 (33.3%) were p53 negative. Of 13 secondary acquired cholesteatoma, 5 (38.5%) were p53 positive and 8 (61.5%) were p53 negative. The p53 results of primary and secondary acquired cholesteatoma cases were not significantly different as well ($p > 0.05$). The relation between p53 results and gender was assessed in the study group, and a relationship was found between gender and p53 positivity ($p < 0.05$). Therefore, hormonal etiology must be thought.

According to cholesteatoma immunohistochemistry, p53 positivity predominated particularly in the basal and suprabasal layers of epidermis. On the other hand, p53 positive cells predominated in the basal layer of the meatal skin.

In conclusion, according to our results, p53 tumor suppressor gene is not related cholesteatoma occurrence significantly. However, the prominence of p53 positive cells in the basal and suprabasal layers in cholesteatoma matrix may suggest the presence of a high proliferative ability in these layers.

KAYNAKLAR

- 1- Chole RL. Chronic otitis media, mastoiditis, and petrositis. In: Cummings CW (eds). Otolaryngology-Head and Neck Surgery (2nd ed). St. Luis, Missouri, Mosby Year Book Inc. 1993: 2823-2839.
- 2- Kojima H, Tanaka Y, Tanaka T, Miyazaki H, Shiwa M, Kamide Y, et al. Cell Proliferation and Apoptosis in Human Middle Ear Cholesteatoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1998; 124: 261-264.
- 3- Sasaki H, Huang CC. Expression of cytokeratins 13 and 16 in middle ear cholesteatoma. Otolaryngol Head Neck Surg 1994; 110: 310-7.
- 4- Ergün S, Zheng XI, Carlsöö B. Antigen Expression of Epithelial Markers, Collagen IV and Ki67 in Middle Ear Cholesteatoma. Acta Otolaryngol (Stockh) 1994; 114: 295-302.
- 5- Bujia 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: 203-206.
- 6- Kambhampati VSS, Sastry R, Sharma SC, Mann SBS, Ganguly NK, Panda NK. Aural Cholesteatoma: Role of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Bone Destruction. Am J Otol 1999; 20: 158-161.
- 7- Albino AP, Reed JA, Bogdany JK, Sassoon J, Desloge RB, Parisier SC. Expression of p53 Protein in Human Middle Ear Cholesteatomas Pathogenetic Implications. Am J Otol 1998; 19: 30-36.
- 8- Ferlito A. A review of the definition, terminology and pathology of aural cholesteatoma [review]. J Laryngol Otol 1993; 107: 483-488.
- 9- Shambaugh GE, Glasscock ME. Surgery of the ear. Philadelphia, WB Saunders Co, 1980.
- 10- Akyıldız N. Kulak Hastalıkları ve Mikroşirürjisi. Ankara, Ogun Kardeşler Matbaacılık, 1995:326-454.
- 11- Sade J. Cellular differentiation in the middle ear lining. Ann Otol Rhinol Laryngol 1971; 80: 376-379.
- 12- Chole RA, Henry KR, Ginun M. Cholesteatoma: spontaneous Occurrence in the mongolian Gebril Meriones unguiculatus, Am J. otol 1981;2: 204-210.

- 13-Axon PR, Fergie N, Saeed SR, Temple RH, Ramsden RT. Petrosal Cholesteatoma: Management Considerations for Minimizing Morbidity. *Am J Otol* 1999; 20: 505-510.
- 14-Dallari S, Cavani A, Berganini G, Girolomoni G. Integrin Expression In Middle Ear Cholesteatoma. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1994; 114: 188-192.
- 15-Proctor B. Chronic otitis media and mastoiditis. In: Paparella MM(eds) *Otolaryngology (2nd ed)*. Philadelphia, Saunders Company, 1980: 1455-1489.
- 16-Palva T. The pathogenesis and treatment of cholesteatoma. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1990; 109: 323-330.
- 17-Weiss P. Cell Contact, *Int Rew Cytol*. 1958; 7: 391-423.
- 18-Palva T, Karma P, Makinen M. The invasion theory. In: Sade J (eds). *Cholesteatoma and mastoid surgery*. Amsterdam. Kugler publishing, 1982.
- 19-Wittmaack K. Wie Entsteht Ein Genuines Colesteatoma. *Arch Otorhinolaringol* 1933; 137:306-309.
- 20-Richartson GS. Additus block. *Ann Otol* 1963; 72: 223-236.
- 21-Lange W. Uber bei Entstehung der Mittlohr-cholesteatoma, *Z Hals Nas Ohrenheilk*.1925;11;250.
- 22-Ruedi L. Acquired cholesteatoma. *Arch Otolaryngol* 1963; 78: 252-261.
- 23-Lim DJ, Birckhg HG, Saunders WH. Aural cholesteatoma epidermidization: fine morphological study.In:McCabe BF,Sade J,Abramson M(eds).*Cholesteatoma: first international conference, ala,1977,AescalapiusPublishing*.
- 24-Chole RA, Tinning SP. Basal lamina breaks in the histogenesis of cholesteatoma, *Laryngoscope* 1984; 95: 270-275.
- 25-Wendt H: Desquamative Entzündung des Mittelohrs. *Arch Ohrenheilk* 1873; 14: 428-432.
- 26-Birrell J F. Cholesteatomaof the attic. *J Laryngol* 1958; 72: 620-625.
- 27-Sade J. The atelectatic ear. In: Sade J (eds). *Secretory otitis media and its sequelae*, New York ,Churchill Livingstone, 1979.

28-Chole RA, Frush DP. Quantitative studies of eustachian tube epithelium during experimental vitamin A deprivation and reversal. In: Sade J (eds). Cholesteatoma and mastoid surgery, Amsterdam, Kugler Publishing, 1980.

29-Çakır N. Otolaringoloji baş ve boyun cerrahisi (1. Baskı) İstanbul, Nobel Tıp Kitapları Ltd Şti, 1996.

30-Graham MD, Goldsmith M. Infections of the ear. In: Lee KJ (eds) Essential Otolaryngology Head and Neck Surgery (7th ed). Stamford, Connecticut, 1998; 707.

31-Michaels L. An epidermoid formation in the developing middle ear : possible source of cholesteatoma. J otolaryngol 1986;15: 169-74

32-Levenson MJ, Michaels L, Parisier SC. Congenital cholesteatomas of the middle ear in children: origin and management. Otolaryngol Clin North Am 1989; 22: 941-54.

33- Austin DF. Chronic Ear Disease. In: Ballenger JJ (eds). Disease of the Nose, Throat, Head, and Neck. (15th ed). Pennsylvania, Lea and Febiger. , 1991: 1111-17.

34-Parisier SC. Management of cholesteatoma. Otolaryngol Clin North Am 1989; 22: 927-40.

35-Smyth GDL, Hassard TH. The evolution of policies in the surgical treatment of acquired cholesteatoma of the tubo-tympanic cleft. J Laringol Otol 1981;95:767-773.

36-Tüzün Y, Tüzün B, Kotoğyan, A. Aydemir D.H, Baransü O. Dermatoloji (2. Baskı), İstanbul, Nobel Tıp Kitap evi, 1994:17-28.

37-Akar N. Klinik moleküller patolojiye giriş (1 baskı), Ankara, Ankara Antıp, 1995: 45-75.

38-Helander SD, Peters MS, Pittelkow MR. Expression of p53 protein in benign and malignant epidermal pathologic conditions [see comments]. J Am Acad Dermatol 1993; 29: 741-8.

39-Bartek J, Bartkova J, Lukas J, et al. Immunohistochemical analysis of the p53 oncoprotein on paraffin sections using a series of novel monoclonal antibodies. J Pathol 1993; 169: 27-34.

40-Kastan MB, Onyinye O, Sidransky D, et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res 1991; 51: 6304-11.

- 41-Soussi T, Legros Y, Lubin R, et al. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review [Review]. *Int J Cancer* 1994; 57: 1-9.
- 42-Başaran N. *Tıbbi Genetik Ders Kitabı* (7. Baskı), Bursa, Nobel tıp kitapevleri, 1999: 374.
- 43-Choufani G, Mahillon V, Decaestecker C, Lequeux T, Danguy A, Salmon I, et al. Determination of the Levels of Expression of Sarcolectin and Calcyclin and of the Percentages of Apoptotic But Not Proliferating Cells to Enable Distinction Between Recurrent and Nonrecurrent Cholesteatomas. *Laryngoscope* 1999; 109: 1825-31.
- 44-Wirht J. *Color atlas of genetics*. Wemding, Georg Thieme Verlag, 1995: 275.
- 45-Kohmura T, Hasegawa Y, Ogawa T, Matsuura H, Takahashi M, Yanagita N, et al. Cyclin D1 and p53 Overexpression Predicts Multiple Primary Malignant Neoplasms of the Hypopharynx and Esophagus. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 125: 1351-54.
- 46-Shinoda H, Huang C. Expression of c-jun and p53 proteins in human middle ear cholesteatoma: relationship to keratinocyte proliferation, differentiation and programmed cell death. *Laryngoscope* 1995; 105: 1232-7.
- 47-Aberg B, Edstrom S, Johannesson A, et al. Evaluation of epidermal hyperproliferation in patients with cholesteatoma. *Am J Otol* 1991; 12: 93-6.
- 48-Bollmann R, Knopp U, Tolsdorff P. DNA cytometric studies of cholesteatoma of the middle ear]. *HNO* 1991; 39: 313-4.
- 49-Desloge RB, Carew JF, Finstad CL, et al. DNA analysis of human cholesteatomas. *Am J Otol* 1997; 18: 135-9.
- 50-Albino AP, Kimmelman CP, Parisier SC. Cholesteatoma: a molecular and cellular puzzle. *Am J Otol* 1998; 19: 7-19.
- 51-Lassaletta L, Brandariz JA, Benito A, Cruz JDL, Gomez C, Ballestin C, et al. P53 Expression in Locally Advanced Pharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 125: 1356-1359.
- 52-Shinoda H, Huang CC. Heat shock proteins in middle ear cholesteatoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 114: 77-83.