

Assessment of Subepithelial Angiogenesis in Acquired Cholesteatoma between Pediatric and Adult Patients

Edinsel Kolesteatomda Subepitelyal Anjiogenezin Pediatrik ve Erişkin Hastalarda Değerlendirilmesi

Mustafa Aslıer¹, Taner Kemal Erdağ¹, Sülen Sarıoğlu², Enis Alpin Güneri¹, Ahmet Ömer İkiz¹, Evren Uzun², Erdener Özer²

Original Investigation

Özgün Araştırma

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Abstract

Objective: The aim of this study was to compare subepithelial angiogenesis developing within the perimatrix of the cholesteatoma between pediatric and adult patients.

Methods: Sixty-one patients who underwent mastoidectomy for the first intent because of chronic otitis media with cholesteatoma between 1993 and 2013 and from whom appropriate tissue specimens were taken were included in the study. The patients were classified in the pediatric patient group if they were under the age of 18 years and the adult patient group if they were 18 years and older. Immunohistochemical staining for CD31 was performed on new sections taken during surgery and sections prepared from archived tissues in paraffin blocks. Results were compared between the groups.

Results: A total of 61 patients, of whom 25 were pediatric and 36 were adult patients, were included in the study. The mean CD-31 immunopositive microvessel rates were 8.8 (3-15) and 6.61 (2-14) for the pediatric and adult patient groups, respectively. The difference between the groups was statistically significant ($p=0.037$). Correlation analysis showed a statistically significant negative correlation between the CD-31 immunopositive microvessel rates and age ($p=0.036$).

Conclusion: Subepithelial angiogenesis developing within the perimatrix of the cholesteatoma of the pediatric patients was more expressed than that of the adult patients.

Keywords: Angiogenesis, CD-31, cholesteatoma, pediatric

Özet

Amaç: Bu çalışmanın amacı kolesteatom perimatriksinde gelişen subepitelyal anjiogenezi pediatrik ve erişkin hastalarda karşılaştırmaktır.

Yöntemler: Çalışmaya 1993-2013 yılları arasında kolesteatomlu otitis media nedeniyle ilk kez mastoidektomi uygulanmış ve uygun doku örnekleri alınmış 61 hasta dahil edildi. Onsekiz yaş altı hastalar pediatrik hasta, 18 yaş ve üstü hastalar ise erişkin hasta grubuna dahil edilecek şekilde sınıflandırıldı. Cerrahi sırasında alınmış ve parafin bloklarında arşivlenmiş dokulardan hazırlanan yeni kesitler üzerinde CD-31 immünohistokimyasal boyamaları yapıldı ve sonuçlar gruplar arasında karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışmaya 25 pediatrik ve 36 erişkin toplam 61 hasta dahil edildi. Ortalama CD-31 immünopozitif mikrodamar sayısı pediatrik ve erişkin hasta gruplarında sırasıyla 8.8 (3-15) ve 6.61 (2-14) olarak saptandı. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p=0.037$). Yaş ve mikrodamar sayısı arasında yapılan korelasyon analizinde negatif yönde ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptandı ($p=0.036$).

Sonuç: Pediatrik hastaların kolesteatom dokularında perimatrikste gelişen anjiogenezi erişkin hastalardakine kıyasla daha fazladır.

Anahtar Kelimeler: Anjiogenezi, CD-31, kolesteatom, pediatrik



Giriş

Kolesteatom, temporal kemik havalı boşlukları içerisinde skuamöz hücreli epitelden gelişmektedir ve merkezinde keratin debrisi içerir. Histopatolojik olarak benign fakat klinik olarak lokal destrüktif seyir gösteren bir hastalıktır. Patogenezi epitel dokusunda artmış hücresel proliferasyon ve keratin üretimi sorumludur (1). Sonuç olarak artan sitokin ve enzim düzeyleri kolesteatom perimatriksinde şiddetli enflamatu-

ar yanıtı sebep olur (2, 3). CD-31 mikrovasküler damar endotelinde bulunan immünohistokimyasal bir belirteçtir ve tümör anjiogenezi tanımlanmıştır (4, 5). Kolesteatomda gelişen hipoksik süreç, doku hasarı ve artan enflamatuvar hücreler, vasküler ve endotelial büyüme faktörleri aracılığı ile anjiogenezi tetikler. Subepitel dokuda yani perimatrikste artan anjiogenezi kolesteatom aktivitesinin biyolojik belirteçlerinden biri sayılabilir (5, 6).

Address for Correspondence/Yazışma Adresi:

Mustafa Aslıer, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Phone: +90 232 412 32 51

E-mail: mustafa.aslier@gmail.com

Received Date/Geliş Tarihi: 10.03.2015

Accepted Date/Kabul Tarihi: 16.05.2015

© Copyright 2015 by Official Journal of the Turkish Society of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery Available online at www.turkarchotorhinolaryngol.org
© Telif Hakkı 2015 Türk Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Derneği Makale metnine www.turkarchotorhinolaryngol.org web sayfasından ulaşılabilir.
DOI:10.5152/tao.2015.1018

Pediyatrik ve erişkin hastalarda kolesteatom perimatrisinde subepitelyal anjiogenezin karşılaştırılmasının amaçlandığı bu geriyeye dönük çalışmada kolesteatom doku örneklerinde perimatrisinde CD-31 ile boyanmış mikrodamar yoğunluğu tespit edildi. Ayrıca yapılan korelasyon analizi ile hasta yaşı ve mikrodamar sayısı arasındaki ilişki araştırıldı.

Yöntemler

Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu başvurusu sonrası 2013/17-15 numaralı etik kurul kararı ile çalışmaya başlandı.

Kliniğimizde 1993-2013 yılları arasında kolesteatomlu kronik otitis media nedeniyle ilk kez mastoidektomi uygulanmış 223 hasta geriyeye dönük olarak tarandı. Bu hastaların cerrahi sırasında alınan doku örnekleri incelendi. Çalışmaya dahil edilme kriterleri; immünohistokimyasal boyama için yeterli ve uygun miktarda epitelyal ve subepitelyal hücre içeren doku örneği alınmış olması, araştırma için onam alınabilmiş olması ve dosya verilerine eksiksiz ulaşılabilir olması şeklinde belirlendi. Bu kriterleri karşılayan 61 hastanın doku örneği çalışmaya dahil edildi. Onsekiz yaş altı hastalar pediyatrik, 18 yaş ve üstü hastalar ise erişkin gruba dahil edilecek şekilde gruplandırıldı.

Hastaların Patoloji Anabilim Dalı arşivinde saklanan parafin bloklarından yeni kesitler hazırlandı. Kesitler 52 dakika 95°C CC1 (cell conditioning 1) (Ventana Medical Systems; Tuscon, Arizona, ABD) solüsyonunda bekletildi ve ardından PECAM'dan (MAB346P) (Innovex Biosciences; Richmond, ABD) 1/50 dilüsyon oranında hazırlanan solüsyon içerisinde 32 dakika inkübe edildi. Boyamalar Benchmark Ultra (Ventana Medical Systems; Tuscon, Arizona, ABD) cihazında Ultraview Universal DAB Detection kit (Ventana Medical Systems; Tuscon, Arizona, ABD) kullanılarak yapıldı. CD-31 boyalı kesit görüntüleri Eclips Ci (Nikon; Tokyo, Japonya) mikroskopta görüntülenerek DS-Fi2 (Nikon; Tokyo, Japonya) kamera ile dijitalize edilerek bilgisayara aktarıldı. Bilgisayar ekranında orijinal büyütmeye x20'de kesit alanındaki CD-31 ile immünopozitif boyanmış mikrodamar sayısı belirlendi (Resim 1).

Elde edilen sonuçların analizinde SPSS 15.0 istatistik programı (IBM, New York, ABD) kullanıldı. Ortalama değerler ile standart sapmaları hesaplandı. Değerkenlerin ortalama değerleri Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Korelasyon analizinde Kendall's tau-b testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi p<0.05 kabul edildi.

Bulgular

Çalışmaya 25 pediyatrik 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 değerşen hastaların yaş ortalamaları 27.31 olarak saptandı [ortalama 27.31 (SS +/-18.345)]. Pediyatrik hasta grubunda 25 (13 kız ve 12 erkek) hasta mevcuttu ve yaş ortalaması 10.6 [ortalama 10.6 (SS +/-4.103)] saptandı. Erişkin hasta grubunda 36 (16 kadın ve 20 erkek) hasta mevcuttu ve yaş ortalaması 38.92 [ortalama 38.92 (SS +/-15.08)] saptandı.

Tablo 1. Pediyatrik ve erişkin gruplardan elde edilen bulgular

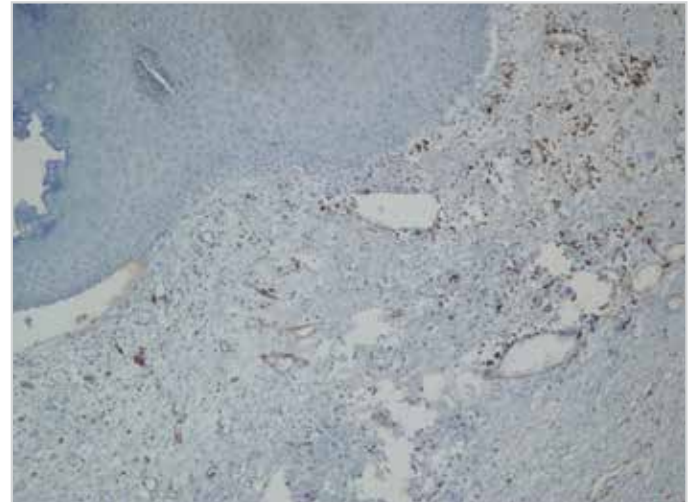
	Pediyatrik grup	Erişkin grup	p
Toplam	25 (13 kadın ve 12 erkek)	36 (16 kadın ve 20 erkek)	
Yaş	ortalama 10.6 (SS +/-4.103) ortanca 10 (3-17)	ortalama 38.92 (SS +/-15.08) ortanca 36.5 (19-71)	
Mikrodamar sayısı	ortalama 8.8 (SS +/- 4.61) ortanca 8 (3-15)	ortalama 6.61 (SS +/- 3,659) ortanca 6 (2-14)	*0.037

*Mann Whitney U

Tablo 2. Korelasyon analizi bulguları

Yaş	Korelasyon katsayısı	Mikrodamar sayısı
		-0.192
	P	*0.036

*Kendall's tau-b



Resim 1. x20 büyütmeye izlenen mikrodamar yapıları

Pediyatrik hasta grubunda mikrodamar sayısı ortalama 8.8 (SS +/-4.61) saptandı. Erişkin hasta grubunda ise mikrodamar sayısı ortalama 6.61 (SS +/- 3.659) olarak saptandı.

Pediyatrik ve erişkin gruplar karşılaştırıldığında CD-31 ile immünopozitif boyanmış mikrodamar sayısı pediyatrik hasta grubunda istatistiksel açıdan anlamlı şekilde yüksek saptandı (p=0.037, Mann Whitney U) (Tablo 1).

Tüm hastaların verileri dahil edilerek yapılan korelasyon analizinde hasta yaşı ile mikrodamar sayısı arasında negatif yönde ve istatistiksel açıdan anlamlı korelasyon saptandı (p=0.036, Kendall's tau-b) (Tablo 2).

Tartışma

Kolesteatom, temporal kemiğin havalı boşlukları içerisinde gelişen skuamoz hücreli epitelden oluşmaktadır. Epitel tabakası pe-

riferde kolesteatom matriksini oluşturur ve merkezinde artmış keratin üretimine bağlı aselüler tabaka yer almaktadır (1). Matriksin çevresinde ise enflamatuar hücrelerden zengin granülasyon dokusu benzeri histopatolojik özelliklere sahip perimatriks tabakası gözlenir. Perimatrikste gelişen enflamasyon ve enzimatik reaksiyonlar kolesteatomun destrüktif seyirinden sorumlu tutulmaktadır (1). Özellikle daha agresif seyirli olduğuna inanılan pediatrik kolesteatomda perimatriksin yapısı ve histokimyasal özellikleri bir çok çalışmada araştırılmıştır.

Quaranta ve ark. (7) pediatrik kolesteatomun klinik özelliklerinden perimatrikste enflamasyonu sorumlu tutmuşlardır. Otuz pediatrik ve 30 erişkin hastanın kolesteatom dokularında perimatriksin histomorfolojik özelliklerini incelemişler ve pediatrik grupta perimatrikste mononükleer hücrelerin sayıca fazla olduğunu saptamışlardır. Bu bulgular ile pediatrik kolesteatomda perimatriksin daha kalın ve aktif olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Mayot ve ark. (8) kolesteatomlu otitis media nedeniyle cerrahi uygulanan 14 pediatrik hastanın doku örneklerini incelemişler ve epidermis ile orta kulak mukozasının karşılaştığı bileşkede şiddetli bir enflamatuar yanıt gözlemişlerdir. Mukozada CD-1 pozitif Langerhans hücreleri, mast hücreleri ve IgA üreten hücreleri saptayarak gecikmiş tip hipersensitivite ile uyumlu bulgular elde etmişler ve kolesteatom patogenezinde mukozada gelişen bu enflamasyonun sorumlu olabileceğini düşünmüşlerdir.

Dornelles ve ark. (9) ise pediatrik ve erişkin hastalarda enflamatuar reaksiyonların merkezi olan perimatriks kalınlığını ölçmüşler ve 27 ile 1277 mikrometre arasında değişen sonuçlar elde etmişlerdir. Erişkin hasta grubunda perimatriks kalınlığının ortalaması daha fazla olmasına karşın korelasyon analizlerinde yaş ile perimatriks kalınlığı arasında ılımlı fakat ters yönde korelasyon saptamışlardır. Kısacası Dornelles ve ark.'nın çalışması sonucunda hasta yaşı arttıkça perimatriks kalınlığı azalmaktadır.

Perimatriksin boyutsal özellikleri dışında belki de daha önemlisi metabolik aktivitesidir. Dornelles ve ark. (10) epitel kalınlığı, perimatriks kalınlığı ve perimatrikste enflamatuar hücre yoğunluğu üzerine pediatrik ve erişkin hastalardan oluşan popülasyonda yaptıkları çalışmada matriks ve perimatriks kalınlığı arasında kuvvetli korelasyon saptamışlardır. Fakat perimatrikste enflamatuar hücre yoğunluğu ile ne hasta yaşı ne de perimatriks kalınlığı arasında korelasyon bulmamışlardır.

Perimatrikste gelişen enflamasyonun şiddetinin değerlendirilmesi için Dornelles ve ark. (5) yine pediatrik ve erişkin kolesteatom dokularından oluşan kesitlerde anjiogenez için CD-31 ve metalloproteinaz (MP) aktivitesi için MP-2 ve MP-9 düzeylerini incelemişlerdir. Pediatrik grupta CD-31 ve MP düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptamışlardır.

Kolesteatomda gelişen hipoksik sürecin enflamatuar reaksiyonları artırdığı ve enflamatuar hücrelerden salgılanan büyüme faktörlerinin anjiogenez tetiklediği üzerinde durulmuştur. Perimatriks-

te artan anjiogenez üzerinde yapılan çalışmalarda Stammberger ve ark. (11) faktör-8 seviyelerini incelemişler ve kolesteatomda normal cilde oranla artmış faktör-8 düzeylerine ulaşmışlardır. Sudhoff ve ark. (12) yaptıkları çalışmada kolesteatom dokusunda artmış anjiogenezden sorumlu β -FGF, TGF- α , TGF- β 1 ve VEGF gibi büyüme faktörlerini hem dış kulak yolu cildine hem de orta kulak mukozasına oranla artmış saptamışlardır.

Tümör anjiogenez üzerine yapılmış çalışmalarda damar endotelinde bulunan bir immünobelirteç olarak CD-31 tanımlanmıştır. Diğer anjiogenez immünobelirteçlerinden farklı olarak lenfatik damarlarda bulunmamaktadır (4, 5). Kolesteatom dokusunda özellikle perimatrikste artan enflamasyonun şiddeti ve anjiogenez yoğunluğu, CD-31 immünopozitif boyanmış mikrodamar miktarının saptanması ile gösterilebilir. Bu nedenle artan CD-31 immünopozitifliği ve mikrodamar sayısı, kolesteatom aktivitesinin biyolojik belirteçlerinden biri olarak kabul edilmiştir (5, 6).

Dornelles ve ark. (5) 60 pediatrik ve 60 erişkin hastayı karşılaştırdıkları çalışmada pediatrik hasta grubunda CD-31 yoğunluğunu 7 (4-11) erişkin hasta grubunda ise 4 (0-10) olarak elde etmişlerdir. Bu farkı istatistiksel açıdan anlamlı saptamışlardır. Aynı çalışmada metalloproteinazların da (sitoplazmik ve nükleer MP-2, MP-9) yüksek saptanması gerekçesiyle CD-31'i enflamasyonun derecesi ile ilişkilendirmişlerdir.

Jin ve ark. (6) epidermal büyüme faktörü reseptörü ve CD-31 düzeyleri üzerine yaptıkları çalışmada 32 kolesteatom dokusunu 6 postaurikuler cilt dokusu ile karşılaştırmışlardır. 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.

Çalışmamızda ise CD-31 immünobelirteçi ile boyanmış mikrodamar sayısı pediatrik hasta grubunda erişkin hasta grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı şekilde yüksek saptandı. Ayrıca yapılan korelasyon analizi sonucunda hasta yaşı arttıkça mikrodamar sayısının azaldığı tespit edildi. Bu sonuç perimatrikste gelişen enflamatuar mekanizmaların anjiogenez artırdığını ve bu özelliğin pediatrik hastalarda daha belirgin olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları gözden geçirildiğinde özellikle daha eski tarihlerde timpanomastoidektomi uygulanmış her hastada doku örneği alınmamış olması ya da alınan doku örneklerinde ileri immünohistokimyasal boyamalar için yeterli olacak şekilde uygun epitel dokusunun bulunmaması, çalışmaya dahil edilen hasta sayısının beklenenden daha düşük kalmasına neden olmuştur. Bir kısım doku örneğinde sadece keratin kümeleri izlenmiş ve epitel dokusu saptanamamıştır. Bu durum göstermektedir ki sadece kolesteatom içeriğinden değil çevre dokuda matriksi ve perimatriksi içerecek şekilde daha bütün biyopsi örnekleri alınması gerekmektedir. Ayrıca alınan örneklerin formaldehitte korunmuş ve parafin bloklarda arşivlenmiş olması

güncel çalışmalarda daha sıklıkla kullanılmaya başlanan mikroRNA, gen ekspresyonu gibi yöntemlerin çalışılabilmesini şu an için imkansız kılmaktadır.

Sonuç

Kolesteatom perimatriksinde saptanan anjiyogenez, enflamatuvar sürecin bir sonucudur ve enflamasyonun şiddeti ile ilişkili kabul edilebilir. Pediatrik hasta grubunda mikrodamar sayısının fazla olması hatta yaş küçüldükçe mikrodamar sayısının artması, bu yaş grubunda artmış enflamatuvar sürecin kolesteatom aktivitesinin destrüktif seyirli ilerlemesinden sorumlu mekanizmalardan birisi olabileceğini göstermektedir.

Ethics Committee Approval: Approved by Ethical Committee for Non-Invasive Human Research at Dokuz Eylül University. Approval number: 2013/17-15

Informed Consent: Written informed consent was not obtained due to the retrospective nature of this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - M.A., T.K.E.; Design - M.A., T.K.E., E.Ö., S.S.; Supervision - E.A.G., A.Ö.İ., E.Ö., S.S.; Funding - M.A. T.K.E.; Materials - T.K.E., E.A.G., A.Ö.İ.; Data Collection and/or Processing - M.A., E.Ö., S.S., E.U.; Analysis and/or Interpretation - T.K.E., M.A., S.S., E.Ö. E.U.; Literature Review - M.A., T.K.E., S.S.; Writing - M.A.; Critical Review - E.A.G., A.Ö.İ., E.Ö., S.S.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This study was financially supported by a grant from Dokuz Eylül University Research Foundation.

Etik Komite Onayı: Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Onay numarası: 2013/17-15

Hasta Onamı: Çalışmanın retrospektif tasarımından dolayı yazılı hasta onamı alınmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - M.A., T.K.E.; Tasarım - M.A., T.K.E., E.Ö., S.S.; Denetleme - E.A.G., A.Ö.İ., E.Ö., S.S.; Kaynaklar - M.A., T.K.E.; Malzemeler - T.K.E., E.A.G., A.Ö.İ.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - M.A., E.Ö., S.S., E.U.; Analiz ve/veya Yorum - T.K.E., M.A., S.S., E.Ö., E.U.; Literatür Taraması - M.A., T.K.E., S.S.; Yazıyı Yazan - M.A.; Eleştirel İnceleme - E.A.G., A.Ö.İ., E.Ö., S.S.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Destekleme Fonu tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Lim DJ, Saunders WE. Acquired cholesteatoma: light and electron microscopic observations. *Ann Otol* 1972; 81: 2-12. [\[CrossRef\]](#)
2. Louw L. Acquired cholesteatoma: summary of the cascade of molecular events. *J Laryngol Otol* 2013; 127: 542-9. [\[CrossRef\]](#)
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. [\[CrossRef\]](#)
4. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31. [\[CrossRef\]](#)
5. 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: 1553-61. [\[CrossRef\]](#)
6. 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: 67-71. [\[CrossRef\]](#)
7. Quaranta A, Ressa L, Santangelo A. Otomastoid cholesteatoma in children: histopathological findings. *Int J Pediatric Otorhinolaryngol* 1986; 12: 121-6. [\[CrossRef\]](#)
8. Mayot D, Béné MC, Faure GC, Wayoff M, Perrin C. Immunohistologic analysis of the cholesteatoma matrix in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1991; 22: 115-24. [\[CrossRef\]](#)
9. Dornelles C, da Costa SS, Meurer L, Schweiger C. Correlation of cholesteatomas perimatrix thickness with patient's age. *Braz J Otorhinolaryngol* 2005; 71: 792-7.
10. 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: 641-8.
11. Stammberger M, Bujía J, Schulz P. Correlation of vascular morphology with clinical types in cholesteatoma of the middle ear. *Am J Otol* 1994; 15: 380-2.
12. 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: 793-8.