TC.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KOLESTEATOM ETYOPATOGENEZİ VE ALTERNATİF MEDİKAL TEDAVİ SEÇENEKLERİ İÇİN İMİQUİMOD, SİKLOSPORİN, TAKROLİMUS, 5-FLOROURASİL MADDELERİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Tankut UZUN

Kulak Burun Boğaz Hastalıkları

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2020

TC.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KOLESTEATOM ETYOPATOGENEZİ VE ALTERNATİF MEDİKAL TEDAVİ SEÇENEKLERİ İÇİN İMİQUİMOD, SİKLOSPORİN, TAKROLİMUS, 5-FLOROURASİL MADDELERİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Tankut UZUN

Kulak Burun Boğaz Hastalıkları

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Hamdi ÇAKLI

ESKİŞEHİR

2020

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Tankut UZUN'a ait 'Kolesteatom Etyopatogenezi ve Alternatif Medikal Tedavi Seçenekleri İçin İmiquimod, Siklosporin, Takrolimus, 5-Florourasil Maddelerinin Etkilerinin Araştırılması' adlı çalışma jürimiz tarafından Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:16.09.2020

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Hamdi Çaklı KBB Anabilim Dalı	İmza
Üye	Prof. Dr. Ş. Armağan İncesulu KBB Anabilim Dalı	İmza
Üye	Prof. Dr. Fatih Oğhan Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı	İmza

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun ...../...../.....tarih ve ...../..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. İ. Özkan Alataş

Dekan

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince beni hayat ve iş disiplini konusunda yönlendiren ve eğiten, yetişmemde büyük emeği olan başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Armağan İNCESULU ve tez hocam Prof. Dr. Hamdi ÇAKLI olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Erkan ÖZÜDOĞRU, Prof. Dr. Cemal CİNGİ, Prof. Dr. Melek Kezban GÜRBÜZ, Doç. Dr. Ercan KAYA, Doç. Dr. Özgür PINARBAŞLI' ya ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca çalışmanın gerçekleştirildiği Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı'nda her zaman desteğini hissettiren değerli hocam Prof. Dr. Didem TURGUT COŞAN ve araştırma görevlisi Dr. İ. Uğur ÇALIŞ'a, istatistiksel incelemelerdeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Ertuğrul ÇOLAK'a teşekkür ederim. Asistanlığım ve tüm eğitim hayatım boyunca desteklerini hiç esirgemeyen aileme; hayattaki tüm engelleri birlikte aştığım zorları kolay yapan biricik eşime çok teşekkür ederim.

ÖZET

Uzun, TU. Kolesteatom Etyopatogenezi ve Alternatif Medikal Tedavi Seçenekleri İçin İmiquimod, Siklosporin, Takrolimus, 5-Florourasil Maddelerinin Etkilerinin Araştırılması, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2020. Kolesteatom; timpanik veya mastoid kavite içerisinde keratinize skuamoz epitel ve subepitelyal bağ doku fragmanlarından oluşan kitle olarak tanımlanmıştır. Kolesteatomun kesin etyopatogenezi halen bilinmemektedir. Günümüzde kolesteatom tedavisinde kabul gören tek küratif tedavi seçeneği olan cerrahinin yüksek maliyeti, morbiditesi ve nüks oranları nedeniyle kolesteatom tedavisinde alternatif medikal tedavi araştırmaları hız kazanmıştır. Kolesteatom patogenezini gözleyebilmek ve alternatif medikal tedavi seçenekleri geliştirebilmek amacıyla kolesteatom nedeniyle opere edilen 3 hastadan alınan kolesteatom dokuları ile kolesteatom doku kültürü oluşturuldu. HEKa hazır hücre dizileri de kültüre edildi. Kolesteatom hücrelerine 5-FU uygulanan(n=9), siklosporin uygulanan(n=9), takrolimus uygulanan(n=9), imiquimod uygulanan(n=12); HEKa hücrelerine 5-FU uygulanan(n=9), siklosporin uygulanan(n=9), takrolimus uygulanan(n=9), imiquimod uygulanan(n=12) ve 48. saatte sitokin ve canlılık düzeyi ölçümleri yapılan gruplar oluşturuldu. Kontrol grubu olarak hiçbir ilaç uygulanmayan ve ölçümleri hemen yapılan kolesteatom grubu(n=3), 48. saatte ölçümleri yapılan 48. saat kolesteatom grubu(n=3), 48. saatte ölçümleri yapılan 48. saat HEKa grubu oluşturuldu(n=3). Kolesteatom 48. saat kontrol grubunda; HEKa 48.saat kontrol grubuna göre IL-6 ve TNF-α seviyeleri yüksek saptanmıştır. Bu sitokinlerin etki mekanizmaları düşünüldüğünde JAK/STAT ve MAPK, PI3K/Akt(PKB) sinyal yolağı ve NFκB proteininin etyopatogenezde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Uygulanan tüm ilaçlar antiinflamatuar, sitotoksik ve antiproliferatif etki göstermiştir. Özellikle İmiquimod 50 µg/ml dozunda güçlü etkisi ile kolesteatomda potansiyel bir tedavi umududur.

Anahtar Kelimeler: Kolesteatom, Hücre Kültürü, İnterlökin, Medikal Tedavi

ABSTRACT

Uzun, TU. Investigation of etiopathogenesis of cholesteatoma and effects of imiquimod, cyclosporine, tacrolimus, 5-fluorouracil substances for alternative medical treatment options, Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Department of Otolaryngology, Medical Specialization Thesis, Eskişehir, 2020. Cholesteatoma is defined as a mass consisting of keratinized squamous epithelium and subepithelial connective tissue fragments within the tympanic or mastoid cavity. Etiopathogenesis of cholestetaoma has still remained unclear. Surgery is the only one acceptable treatment of cholesteatoma currently but; investigation of alternative medical treatment options of cholesteatoma speed up because of high cost, morbidity, recurrence rate of surgery. In order to observe the pathogenesis of cholesteatoma and to develop alternative medical treatment options, cholesteatoma tissue culture was formed with cholesteatoma tissues obtained from 3 patients who operated for cholesteatoma. HEKa ready cell lines were also cultured. 5-FU applicated(n=9), cyclosporine applicated(n=9), tacrolimus applicated(n=9), imiquimod applicated(n=12) cholesteatoma cells; 5-FU applicated(n=9), cyclosporine applicated(n=9), tacrolimus applicated(n=9), imiquimod applicated(n=12) HEKa cells were separated groups and 48th hour cytokines and viability measurements were established. As the control group, cholesteatoma group(n=3) without any application and measured immediately, 48th hour cholesteatoma group (n=3), measured at 48th hour, and 48th hour HEKa group(n=3), measured at 48th hour, were formed. In the 48th hour control group of cholesteatoma; IL-6 and TNF-α levels were found to be higher than the 48th hour control group of HEKa. Considering the mechanism of action of these cytokines, the JAK/STAT, MAPK, PI3K/Akt(PKB) signal pathway and NFκB protein are thought to play an important role in the etiopathogenesis of cholesteatoma. All drugs applications showed anti-inflammatory, cytotoxic and antiproliferative effects. Especially Imiquimod is a potential treatment prospect in cholesteatoma because of strong effect at the dose of 50 µg / ml.

Key Words: Cholesteatoma, Cell Culture, Interleukin, Medical Treatment

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLOLAR DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kolesteatom	4
2.1.1. Tanım ve Tarihçe	4
2.1.2. Epidemiyoloji	4
2.1.3. Kolesteatom Tipleri	5
2.1.4. Kolesteatom Histopatolojisi	6
2.1.5. Kolesteatom Etyopatogenezi	7
2.1.6. Kolesteatom Moleküler Biyolojisi	10
2.1.7. Kolesteatom Hücre Proliferasyonundaki Sinyal Yolakları	12
2.1.8. Kolesteatomun Medikal ve Cerrahi Tedavi Seçenekleri	17
3.GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Deney Planı	21
3.1.1. Kolesteatom Dokusu Elde Edilmesi ve Transportu	22

3.1.2. Kolesteatom Doku Kültürü ve HEKa Hücre Kültürü Oluşturulması 22

3.1.3. Çalışma Grupları 26

3.1.4. İlaçların Hücrelere Uygulanması 28

3.1.5. Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi ve Canlılık Ölçümleri 28

3.1.6. İstatistiksel Analiz 29

4.BULGULAR 30

4.1. IL-1 Standart (Std) Tablo ve Grafiği 30

4.2. IL-6 Standart (Std) Tablo ve Grafiği 30

4.3. IL-8 Standart (Std) Tablo ve Grafiği 31

4.4. IL-10 Standart (Std) Tablo ve Grafiği 32

4.5. TNF-α Standart (Std) Tablo ve Grafiği 32

4.6. Ki67 Standart (Std) Tablo ve Grafiği 33

4.7. Hücre Kültürü Bulguları 33

4.8. Grupların Sitokin Düzeyleri Ölçümü 34

4.8.1. IL-1 Sitokin Düzeyleri 34

4.8.2. IL-6 Sitokin Düzeyleri 36

4.8.3. IL-8 Sitokin Düzeyleri 38

4.8.4. IL-10 Sitokin Düzeyleri 41

4.8.5. Ki67 Sitokin Düzeyleri 44

4.8.6. TNF-α Sitokin Düzeyleri 47

4.9. Grupların Canlılık Ölçümleri 48

5. TARTIŞMA 51

6.SONUÇ ve ÖNERİLER 67

KAYNAKLAR 69

SİMGELER VE KISALTMALAR

CWU:	Canal wall up
CWD:	Canal wall down
DMEM:	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
EANO:	The European Academy of Otology and Neurotology
EGF:	Epidermal Growth Factor
EGFR:	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ERK:	Extracelluar signal-regulated kinase
ESOGUTF:	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
FBS:	Fetal bovin serum
Gm-CSF:	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
HaCat:	Immortal human keratinocytes
HEKa:	Human Epitelyal Keratinocyte
HBSS:	Hank’s Buffered Salt Solution
Id:	Inhibitor of DNA Binding/Differentiation
IL:	Interlökin
JOS:	Japanese Otological Society
KGF:	Keratinocyte Growth Factor
KGFR:	KGF Receptor
LPS:	Lipopolisakkarit
MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinase
miRNA:	MicroRNA
MRG:	Manyetik rezonans görüntüleme

NFaTc:	T hücre nükleer faktör sitoplazmik kısmı
NF-κB:	Nuclear Factor kappa B
PAMPs:	Pathogen-associated molecular patterns
PBS:	Phospate buffered saline
PDGF:	Platelet-derived growth factor
PKB:	Protein Kinase B
PTEN:	Phosphatase and tensin homologue
PTHrP:	Parathormon related peptid
RANKL:	Receptor activator of NF-κB ligand
STAT:	Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF-α:	Transforming growth factor α
TLR:	Toll Like Receptor
TNF-α:	Tumor necrosis factor α
5-FU:	5-Florourasil

ŞEKİLLER

Sayfa

2.1. : Kolesteatomun moleküler patogenez mekanizması 11

2.2. : EGFR/PI3K/PKB Sinyal Yolağı 13

2.3. : MAPK Sinyal Yolağı 14

2.4. : IL6/STAT3 Sinyal Yolağı 15

2.5. : Id-1/ NF- κB/Siklin D1 Sinyal Yolağı 15

2.6. : KGF/KGFR Sinyal Yolağı 17

4.1. : Absorbans – IL-1 Düzeyi(ng/L) İlişkisi Grafiği 30

4.2. : Absorbans – IL-6 Düzeyi(ng/L) İlişkisi Grafiği 31

4.3. : Absorbans – IL-8 Düzeyi(ng/L) İlişkisi Grafiği 31

4.4. : Absorbans – IL-10 Düzeyi(ng/L) İlişkisi Grafiği 32

4.5. : Absorbans – TNF-α Düzeyi(ng/L) İlişkisi Grafiği 32

4.6. : Absorbans – Ki67 Düzeyi(ng/L) İlişkisi Grafiği 33

TABLOLAR

Sayfa

3.1. : Keratinosit Büyüme Kiti Bileşenleri 24

4.1: Absorbans – IL-1 Düzeyi(ng/L) İlişkisi Tablosu 30

4.2: Absorbans – IL-6 Düzeyi(ng/L) İlişkisi Tablosu 30

4.3. : Absorbans – IL-8 Düzeyi(ng/L) İlişkisi Tablosu 31

4.4. : Absorbans – IL-10 Düzeyi(ng/L) İlişkisi Tablosu 32

4.5. : Absorbans – TNF-α Düzeyi(ng/L) İlişkisi Tablosu 32

4.6. : Absorbans – Ki67 Düzeyi(ng/L) İlişkisi Tablosu 33

4.7. : IL-1 Sitokin Düzeyleri Ortalama ve Standart Sapma Değerleri 34

4.8. : IL-6 Sitokin Düzeyleri Ortalama ve Standart Sapma Değerleri 36

4.9. : IL-8 Sitokin Düzeyleri Ortalama ve Standart Sapma Değerleri 39

4.10. :IL-10 Sitokin Düzeyleri Ortalama ve Standart Sapma Değerleri 42

4.11. :Ki67 Sitokin Düzeyleri Ortalama ve Standart Sapma Değerleri 44

4.12. : TNF-α Sitokin Düzeyleri Ortalama ve Standart Sapma Değerleri 47

4.13. :Canlılık Yüzdeleri Standart Sapma ve Ortalama Değerleri 49

RESİMLER

Sayfa

2.1. : Kolesteatom Histolojisi 6

3.1. : JuLI™ Br Cihazı 23

3.2. : Kültür Aşamalarının Gerçekleştirildiği İnkübatör ve İnverted Mikroskop 25

3.3. : Ekim ve Pasajlama İşlemlerinin Gerçekleştirildiği Laminar Kabin (Class II), Su Banyosu, İnverted Mikroskop 25

3.4. : Kabinde Pasajlama İşlemi 26

4.7. : Primer Kolesteatom Dokularına Ait Keratinosit Kültürü 33

1.GİRİŞ

Kolesteatom; timpanik veya mastoid kavite içerisinde keratinize skuamoz epitel ve subepitelyal bağ doku fragmanlarından oluşan, sürekli keratin debris üreten kitle olarak tanımlanmıştır(1). Literatürde çok sayıda çalışma olmakla birlikte kolesteatom insidansı erişkinlerde 100.000'de 9,2 olarak saptanmıştır(2). Kolesteatom dokusu kemik rezorbsiyonu yapması sebebiyle destruktif ilerleyerek işitme kaybı, vestibüler disfonksiyon, fasiyal paralizi, menenjit, beyin absesi gibi önemli komplikasyonlara sebep olmaktadır(3). Günümüzde kolesteatom tedavisinde kabul gören küratif tek tedavi seçeneği cerrahidir. Cerrahinin amacı hastalıktan tamamen temizlenmiş, akıntısız, kuru bir kulak oluşturmaktır(4). Gelişen cerrahi teknikler ve teknolojiye rağmen endoskopik veya klasik tüm cerrahi tekniklerde kolesteatom nüksleri farklı oranlarda görülebilmektedir(5, 6). Cerrahinin yüksek maliyeti, morbiditesi ve nüks oranları nedeniyle günümüzde kolesteatom tedavisinde medikal tedavi araştırmaları hız kazanmıştır(7). Buna rağmen etyopatogenez halen tam olarak ortaya konulamamıştır ve kolesteatom gelişimi ile ilgili farklı teoriler ortaya atılmıştır(8). 2017 yılında *The European Academy of Otology and Neurotology ve Japanese Otological Society* (EAONO/JOS) tarafından yapılan güncel sınıflamada kolesteatom konjenital, akkiz(edinsel) ve klasifiye edilemeyen olarak 3 başlıkta ele alınmıştır(1).

Derlacki ve Klemis(9) konjenital kolesteatomu timpanik membran perforasyonu ve orta kulak enfeksiyonu hikayesi olmadan orta kulakta kolesteatom dokusu varlığı olarak tanımlamıştır. Konjenital kolesteatom gelişimine yönelik farklı teoriler olmakla birlikte fetal ve embriyolojik hayattaki gelişim sırasında bu dokunun orta kulakta kaldığı görüşü kabul görmektedir(10). Konjenital kolesteatom; kolesteatom vakaları içinde nadir görülmektedir ve tahmini insidansı 100.000'de 0.12'dir(11). Akkiz kolesteatom ise kronik otitis mediadaki inflamatuar süreçler sonucunda oluşmaktadır ve patogenezine yönelik bugüne kadar kabul görmüş 4 teori mevcuttur: İnvajinasyon teorisi, bazal hücre hiperplazisi, migrasyon teorisi, skuamoz metaplazi. Bu teorilerin hiç biri akkiz kolesteatom patogenezini tek başına açıklayamamaktadır. Günümüzde akkiz kolesteatom gelişiminde kronik otitis mediadaki inflamatuar süreçlerin başlattığı, immun yanıtla indüklenen, kompleks hücresel moleküler mekanizmaların görev aldığı kabul edilmektedir(8, 12).

Çalışmaların yoğunlaştığı bu kompleks yolaklar *Epidermal Growth Factor Receptor(EGFR)/Phosphoinositide 3-Kinase(PI3K)/Protein Kinase B(PKB)* sinyal yolağı, *Mitogen-Activated Protein Kinase(MAPK)* sinyal yolağı, *IL-6/Signal Transducer and Activator of Transcription* 3(STAT) sinyal yolağı, *Inhibitor of DNA Binding/Differentiation-1(Id-1)/NF-κB/CyclinD1* sinyal yolağı, *MicroRNA(miRNA)* aracılı sinyal yolağı, *Keratinocyte Growth Factor(KGF)/KGF Receptor(KGFR)* sinyal yolağı olarak özetlenebilir. Kolesteatom etyopatogenezinde etkili olduğu düşünülen tüm bu kompleks yolaklar sonucunda kolesteatom matriksinden IL-1, IL-6, IL-8 gibi inflamatuar mediatörler salınmaktadır ve bu kontrolsüz inflamatuar süreç sonucunda mevcut komplikasyonlar oluşmaktadır(12, 13).

Günümüzde kolesteatom medikal tedavisinde bu kontrolsüz inflamasyon sürecinin durdurulması amaçlanmaktadır. Alternatif medikal tedavi seçenekleri oluşturmak için çalışmamızda denenen moleküllerden İmiquimod TLR-7, Siklosporin ve Takrolimus ise kalsinörin yolağı üzerinden NF-κB'yı etkileyerek antiinflamatuar ve antitümöral etkinlik göstermektedir. Pirimidin analoğu olan 5-florourasil ise timidilat sentaz inhibisyonu ile bahsedilen diğer moleküller gibi epitelyal tümör ve hastalıklarda antitümoral ve antiinflamatuar etkinlik göstermekte ve bu hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Seçilen moleküllerden 5-florourasil haricindeki maddeler daha önce kolesteatom dokusu üzerine uygulanmamıştır. Kolesteatom medikal tedavisi üzerine olumlu etkileri daha önce gösterilen 5-florourasil de ototoksik etkileri nedeniyle medikal tedavi seçenekleri arasına girememiştir(14-17).

Kolesteatomun günümüzde kabul gören tek küratif tedavisi olan cerrahide görülen yüksek nüks oranları, hasta takibinde tekrarlayan cerrahileri engelleyecek, hastalık kontrolünü sağlayacak alternatif medikal tedavi araştırmalarını zorunlu kılmıştır. Bu sebeple çalışmada; kolesteatom patogenezini gözleyebilmek amacıyla kolesteatom nedeniyle opere edilen 3 hastadan alınan kolesteatom dokuları ile kolesteatom hücre kültür modellemesi yapılacaktır. Sonrasında kolesteatom hücre kültürüne farklı mekanizmaları hedef alan bu moleküller uygulandıktan sonra inflamatuar marker düzeyleri ölçülüp kolesteatom hücreleri incelenecektir. İnceleme sonucunda kolesteatomun kontrolsüz inflamatuar süreçlerinin durdurulması beklenmektedir.

Bu prospektif çalışma ile kolesteatom etyopatogenezine yönelik aydınlatıcı verilerin toplanması ve alternatif medikal tedaviler geliştirilmesi için literatüre katkı sunulması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolesteatom

2.1.1. Tanım ve Tarihçe

Kolesteatom; timpanik veya mastoid kavite içerisinde keratinize skuamoz epitel ve supepitelyal bağ doku fragmanlarından oluşan, sürekli keratin debris üreten kitle olarak tanımlanmıştır. Bu tanım EAONO/JOS tarafından 2017 yılında yapılan son tanımlamadır(1). Kolesteatom üzerine literatürdeki ilk bulgulara 1683 yılında Fransız anatomist DuVerney'in(18) çalışmalarında rastlanmaktadır. Fakat kolesteatom kelimesinin ortaya çıkışı her ne kadar isimlendirme bugünkü bilgilerimizle yanlış olarak kabul edilmesine rağmen 1838 yılında Alman fizyolog Johannes Muller(19) tarafından yapılmıştır. Muller hastalığı latince *kole* (kolesterol), *steat* (yağ), *oma* (tümör) kelimelerinin birleşimi olarak kolesteatom şeklinde ilk kez ifade etmiştir. Kolesteatom asla yağ doku içermemesine rağmen bu tanım öylesine benimsenmiştir ki günümüzde halen kullanılmaktadır(20). 1962 yılında Gray(21) kolesteatom için yanlış yerde bulunan deri tanımlamasını yapmış, Sade(22) ise bugünkü tanıma yakın bir şekilde timpanik kavitede bulunan makroskobik düzeyde keratin üreten, kemik destruksiyonuna yol açan skuamoz epitel olarak kolesteatomu tanımlamıştır.

2.1.2. Epidemiyoloji

Kolesteatom insidansı bölgelere ve ülkelere göre yaş, cinsiyet, genetik, coğrafi ve sosyoekonomik faktörlere bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir(23). Tos(24) çalışmasında insidansı çocuklarda 100.000'de 3-15, erişkinde ise 9-12,6 olarak saptarken; Kemppainen ve arkadaşlarının(2) Finlandiya'daki kolesteatom insidansı üzerine yaptıkları araştırmada ise çocuklarda 100.000'de 3, erişkin popülasyonda 9,2 olarak insidans saptanmıştır. Yarık damak dudak hastalarında, beyaz ırkta ve erkek cinsiyette kolesteatomun daha sık görüldüğü belirtilmiştir(2).

2.1.3. Kolesteatom Tipleri

Konjenital ve akkiz (edinsel) kolesteatom olarak sınıflandırılan tiplendirmeye 2017 yılında klasifiye edilemeyen tip de eklenmiştir(1). Kliniklerine göre ayrılan bu tipler histolojik olarak ayrılamamaktadır ve moleküler mekanizmalara yönelik bir farklılık da ortaya konulamamıştır(25).

Konjenital Kolesteatom

1960'larda Derlacki ve Klemis(9) konjenital kolesteatomu timpanik membran perforasyonu ve orta kulak enfeksiyonu hikayesi olmadan orta kulakta kolesteatom dokusu varlığı olarak tanımlamıştır. Bu tanım günümüzde de genel hatları ile geçerliliğini korumaktadır. Konjenital kolesteatom vakaları tüm kolesteatom vakaları içinde nadir görülmektedir(11). Konjenital kolesteatomun patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Patogenezi açıklamaya yönelik bugüne kadar ortaya 4 teori atılmıştır: Migrasyon teorisi, amniyotik sıvı kontaminasyon teorisi, inklüzyon teorisi, epidermoid formasyon teorisi. Bu teorilerin hiçbiri hastalığı tek başına tam olarak açıklayamamıştır. Günümüzde konjenital kolesteatom dokusunun fetal ve embriyolojik hayattaki gelişim sırasında orta kulakta kaldığı kabul edilmektedir; fakat etyopatogenez hala açıklanamamıştır(10).

Akkiz (Edinsel) Kolesteatom

Akkiz kolesteatom kendi içerisinde primer ve sekonder olarak ikiye ayrılmaktadır:

Primer Akkiz Kolesteatom

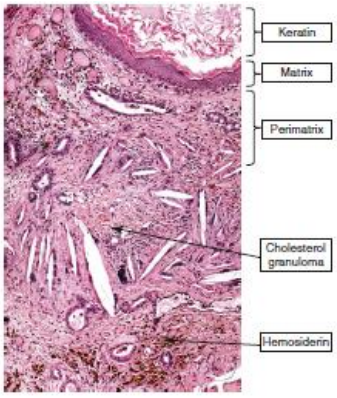
Primer akkiz kolesteatom edinsel kolesteatom vakalarının büyük çoğunluğunu oluşturur. Destrukte epitelin sağlam kulak zarı arkasında poş oluşturarak kolesteatoma yol açması olarak tanımlanabilir. Erişkinlerde pars flaccida retraksiyonu ile attikte çocuklarda pars tensada sık görülür(26).

Sekonder Akkiz Kolesteatom

Sekonder akkiz kolesteatom enfeksiyon, travma veya cerrahi sonucunda perfore kulak zarından dış kulak yolu epitelinin migrasyonu ile gelişen kolesteatom tipidir(26). Akkiz kolesteatomların patogenezi detaylı olarak ilgili konu başlığında ele alınacaktır.

2.1.4.Kolesteatom Histopatolojisi

1829'da Cruveilhier'in(27) kolesteatom makroskobisi üzerine 'inci tümör' tanımlamasını yapmasının ardından bugün kolesteatom histopatolojisi hakkında çok daha detaylı bilgiye sahibiz. Kolesteatom dokusu histolojik olarak matriks, perimatriks ve keratin debrisinden oluşmaktadır. Kolesteatomun merkezinde matriks tarafından sarılan deskuame epitel artıkları, keratin debrisler yer alır. Matriks germinatif membran fonksiyonu görerek epitel proliferasyonunu ve hiperkeratozisi yüzeyde uyarır. Bu proliferasyon zamanla bazal tabakanın da altına inip supepitelyal bölgeye ilerleyerek kolesteatom progresyonuna yol açar. Kolesteatom matriksi histolojik ve hücresel yapı olarak dış kulak yolu epiteli ile benzerdir. Fakat epitel katmanları ve hücre içeriği farklılık gösterir. Matrikste normal epitelden farklı olarak bol miktarda Langerhans hücresi antijen sunucu olarak bulunur. Perimatriks ise granulasyon dokusu yapısındadır ve matriks ile etkileşimi, kolesteatomdaki kronik inflamasyonun ve destruktif süreçlerin asıl sebebidir(26).



Resim 2.1: Kolesteatom Histolojisi

(Mansour S, Magnan J, Nicolas K, Haidar H. Cholesteatoma. Middle Ear Diseases: Springer; 2018. p. 318 alınmıştır)

2.1.5. Kolesteatom Etyopatogenezi

Kolesteatom etyopatogenezi yapılan çok sayıda çalışmaya rağmen tam olarak ortaya konulamamıştır. Konjenital kolesteatom dokusunun fetal ve embriyolojik hayattaki gelişim sırasında orta kulakta kaldığı kabul edilmektedir(10). Konjenital kolesteatom gelişimine yönelik teoriler 2.1.3. kolesteatom tipleri başlığında anlatılmıştır. Kolesteatom vakalarının büyük çoğunluğunu oluşturan akkiz kolesteatom etyopatogenezine yönelik günümüzde çok sayıda çalışma yapılmıştır; bu çalışmalar sonucunda etyopatgenez ile ilgili önemli verilere ulaşılmıştır(12, 13).

Akkiz kolesteatom patogenezine yönelik tarihsel açıdan önemi olan 4 teori ortaya atılmıştır: İnvajinasyon, immigrasyon, skuamoz metaplazi ve bazal hücre hiperplazisi teorisi. Fakat konjenital kolesteatomda olduğu gibi hiçbir teori tüm akkiz kolesteatom tiplerinin patogenezini tek başına açıklayamamıştır(23).

İnvajinasyon Teorisi

Wittmaack(28) 1933 yılında yaptığı tanımlama ile bu eski ama kapsamlı teoriyi ortaya atmıştır. Orta kulağın havalanma bozukluğu sonucunda oluşan negatif basınç ve inflamasyonun hem retraksiyon poşu oluşumuna hem de epitel proliferasyonuna yol açarak kolesteatoma sebep olduğunu ifade eder. Orta kulaktaki havalanma bozukluğuna bağlı gelişen kronik inflamasyon; retraksiyon poşunda prolifere deskuame epitelin birikmesine sebep olarak kolesteatom gelişimine yol açacaktır. Bu teori primer akkiz kolesteatomları açıklamaktadır(23). Fakat östaki fonksiyonu normal olan hastalarda da kolesteatomun görülmesi, negatif orta kulak basıncının retraksiyon poşu oluştursa da tek başına kolesteatom oluşturacak etkiyi gösterememesi teorideki eksiklerden yalnızca birkaçıdır(29). Günümüzde bu teorideki eksik noktaları gidererek Marchionni ve ark.(30) disventilasyon sendromunu, Jackler ve ark.(29) mukozal traksiyon teorisini tanımlamıştır.

Migrasyon Teorisi

Habermann(31) 1888 yılındaki ve Bezold(32) 1890 yılındaki tanımlamaları ile bu eski ama hala geçerliliğini koruyan teorinin sahipleridir. Enfeksiyöz, travmatik

veya iatrojenik sebeplere bağlı olarak oluşan timpanik membran perforasyonundan dış kulak yolu epitelinin ilerleyerek kolesteatom oluşturduğunu belirtir. Bu teori sekonder akkiz kolesteatomları açıklamaktadır(26). Fakat bu teori timpanik membran perforasyonu olmadan gelişen kolesteatomları açıklayamaz ve bu yaygın bir durumdur(29).

Skuamoz Metaplazi Teorisi

Von Trolsch(33) tarafından 1864'te oluşturulan bu teori, kolesteatom etyopatogenezine yönelik en eski teorilerden biridir. Orta kulak mukozasının gelişen kronik inflamasyon sonucunda skuamoz metaplazi ile kolesteatoma dönüştüğünü savunur. Kronik inflamasyon sonucunda mukozada metaplazi gelişmektedir; fakat bu dönüşüm asla kolesteatoma ilerlememektedir(23). Ayrıca kolesteatom ve orta kulak mukozasının sitokeratin düzeyleri incelendiğinde orijinlerinin farklı olduğu görülmüştür(34). Bu teori günümüzde kabul görmemektedir.

Bazal Hücre Hiperplazisi Teorisi

İlk kez Lange tarafından 1925 yılında ortaya atılmıştır(35). Pars flaccidadaki epitel hücrelerinin inflamatuar süreçler sonucunda psodopodlar ve keratin içeren mikrokistler oluşturarak subepitelyal tabakaya inmeleri ile kolesteatom gelişiminin başladığını savunur(23). Özelikle adeziv otitli hastalarda yapılan elektron mikroskobu incelemelerinde de bu yapı gözlenmiştir(36). Bu teorinin timpanik membranın intakt olduğu, retraksiyon poşu izlenmeyen vakalarda kolesteatom gelişiminin basamaklarını açıklamaya katkısı olduğu savunulmaktadır(37, 38).

Tarihsel önemi olan bu 4 teoriden hareketle günümüzde kolestetaom etyopatogenezine yönelik yeni teoriler ve çalışmalar ortaya konmuştur(39):

Selektif Epitimpanik Disventilasyon Sendromu

İnvajinasyon teorisinin geliştirilmesi ile Marchionni ve ark.(30) selektif epitimpanik disventilasyon sendromunu tanımlamıştır. Çalışmanın temelini Palva ve

ark.(40, 41) orta kulak anatomisinin epitimpanik havalanma ve orta kulağın inflamatuar hastalıklarına etkisine yönelik çalışmaları oluşturmaktadır. Otoendoskopik cerrahi geçiren, östaki tüpü fonksiyonu normal olan attik retraksiyon poşu veya attik kolesteatomu olan hastalarda komplet tensor fold nedeniyle epitimpanik bölgenin mezotimpanumdan tamamen ayrıldığı, havalanmasının bozulduğu ve primer akkiz kolesteatomların patogenezinde bu bozulmuş aerasyonun çok önemli olduğu ortaya konmuştur. Selektif disventilasyon sendromu normal östaki fonksiyonunun tek başına epitimpanik bölge havalanmasında yeterli olmadığını inkomplet tensor fold ve açık timpanik istmusun bu bölge havalanması için gerekli olduğunu ifade eder. Bu mekanizmanın bozulması attik retraksiyon poşu ve attik kolesteatom gelişiminin önemli bir sebebidir(30).

Kolesteatom: Defektif Yara İyileşmesi Süreci

Güncel bir teori olarak kolesteatomun bozulmuş bir yara iyileşme süreci olabileceği varsayılmaktadır. Kronik inflamatuar süreç sonucunda orta kulakta oluşan immun yanıtın kontrolden çıkarak otokrin bir süreci başlattığı varsayılmaktadır(12). Her ne kadar yapılan çalışmalarda kolesteatom oluşumunda bu bozulmuş yara iyileşme sürecinin önemli bir rolü olduğu immunohistokimyasal olarak ortaya konsa da kronik otitli her hastada neden kolesteatom gelişmediği açıklanamamıştır(39, 42). Günümüzde kolesteatom üzerine yapılan moleküler biyoloji ve etyopatogenez çalışmaları bu konu üzerine yoğunlaşmıştır(12).

Mukozal Traksiyon Teorisi

Kolesteatom etyopatogenezine yönelik en son teori Jackler ve ark.(29) tarafından 2015 yılında ortaya atılmıştır. Teori; orta kulak mukozasındaki silier hareketin ve timpanik membran iç yüzeyindeki mukozal göçün gözlenmesi ve buna bağlı yapılan çıkarımlara dayanmaktadır. Timpanik membran iç yüzeyi ve orta kulak kemikçikleri lateral yüzeyi arasındaki etkileşim (*mucosal coupling)* retraksiyon poşlarının kolesteatoma ilerlemesinde indükleyici güçtür. Bu teoriye göre kolesteatom mukozal bir hastalıktır ve bu durum hayvan ve insan deneylerinde gözlenmiştir. Mukozal etkileşimin engellenmesinin kolesteatom gelişiminde

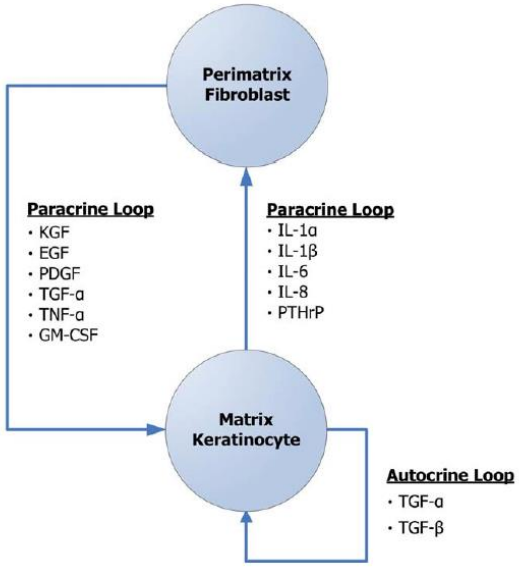
terapotik yaklaşım olduğu savunulmuştur. Bu teori primer akkiz kolesteatom patogenezine yönelik önemli veriler sunmaktadır(29).

Görüldüğü üzere kolesteatom etyopatogenezi kompleks ve hibrid bir süreçtir. Hiçbir teori tek başına kolesteatomdaki proliferatif, destruktif, agresif süreçlerin tümünü birden açıklayamamaktadır. Bu nedenle sürece yönelik daha fazla moleküler düzeyde çalışmaya ihtiyaç vardır(12).

2.1.6.Kolesteatom Moleküler Biyolojisi

Kolesteatom etyopatogenezindeki bilinmezler modern teknolojilerin de yardımıyla araştırmacıları moleküler ve hücresel düzeyde kolestetaomu incelemeye yönlendirmiştir. Kolesteatomdaki kontrolsüz hücre proliferasyonunun, destruktif seyreden inflamatuar süreçlerin anlaşılması için hücre sinyal yolakları, kolesteatom moleküler biyolojisi üzerine birçok araştırma yapılmıştır(12).

Kolesteatomdaki kronik inflamatuar sürecin matrikste bulunan keratinositlerle perimatrikste bulunan fibroblastlar arası gelişen parakrin ve otokrin etkileşimler sonucu olduğu düşünülmektedir. Matriks keratinositlerinden kompleks hücresel sinyal yolakları sonucunda salınan IL-1, IL-6, IL-8, PTHrP gibi inflamatuar stokinler perimatriks fibroblastlarını etkileyerek KGF, EGF, *tumor necrosis factor α* (TNF-α), *transforming growth factor α*(TGF- α), *platelet-derived growth factor*(PDGF), *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor* (Gm-CSF) gibi sitokinlerin salınmasına yol açarak matriks keratinositlerini yeniden uyarır. Oluşan bu kısır döngü kolesteatom etyopatogenezindeki temel hücresel mekanizmadır(43-46).



Şekil 2.1: Kolesteatomun moleküler patogenez mekanizması

(Kuo CL. Etiopathogenesis of acquired cholesteatoma: prominent theories and recent advances in biomolecular research. The Laryngoscope. 2015;125(1):234-40.)

Parakrin ve otokrin olarak indüklenen inflamatuar süreç kolesteatomdaki kemik rezorbsiyonunun ve komplikasyonların da en önemli sebebidir. Özellikle IL-1, IL-6, IL-17 ve PTHrP osteoklastları uyararak destruktif süreci başlatır(47-49). Bu sitokinler *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*(RANKL) uyararak osteoklastogenezi uyarır. Aktive edilmiş B ve T lenfositlerin de osteoklastogenezdeki önemli RANKL kaynakları olduğu bilinmektedir. RANKL aracılı başlayan bu mekanizma kolesteatom yapısındaki hücrelerden matriks-metalloproteinazların(MMP) salınmasıyla kemik destruksiyonu ile sonuçlanır(8, 47, 50)

Mevcut inflamatuar süreci artıran önemli bir etken de kronik otitlere bağlı orta kulakta kolonize olan bakterilerdir. Bakterilerin sahip olduğu lipopolisakkaritler(LPS) doğal ve kazanılmış bağışıklık elemanlarını harekete geçirirler. *Toll like receptors*(TLR) antijen sunucu hücre, makrofaj, epitelyal, endotelyal hücre ve T lenfositlerde bulunan, patojen ünitlerine karşı reaksiyon oluşturan, hücre yüzeyinde ve sitoplazmada yer alan reseptörlerdir(51). İnsan epitel hücrelerinde bilinen yaklaşık on kadar TLR mevcuttur, mikroorganizmalara karşı immun yanıtta koruyucudurlar. TLR1, 2, 4, 5, 6 hücre yüzeyinde yer alıp LPS ile

uyarılırken; TLR 3, 7, 8, 9 sitoplazmada yer alır ve patojen nükleik asitleri ile uyarılır(52). *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) TLR uyarımı yaparak bu inflamatuar kaskadın ve immun yanıtın başlamasında önemli rol oynar(53, 54). Bu uyarım kolesteatom etyopatogenezinde de önemli rol oynayan NF-κB uyarımı ile inflamatuar kaskadı başlatır(55). Yapılan çalışmalar kronik otitis media hastalarında TLR2 ve TLR4 ekspresyonunun arttığını ve patogenezde bunun önemli rol oynadığını otaya koymuştur(56, 57). Kolesteatom patogenezinde bakteriler kolesteatom dokusundaki keratin tabakanın oluşturduğu elverişli ortam ile orta kulakta biofilm oluştururlar. Bu tabakadaki lipopolisakkaritler TLR etkileşimi ile immun yanıtı kronik olarak agresif olarak indükleyerek hücresel patogenezi ve destruksiyonu artırır(58-60). TLR mekanizması günümüzde kolesteatom etyopatogenezinde alternatif tedavi seçenekleri için yoğunlaşılan yolakların başında gelmektedir.

Kolesteatomdaki kontrolsüz hücre proliferasyonunun bir sebebi de apopitoz-antiapopitoz mekanizmalar arasındaki dengenin bozulmasıdır. Yapılan çalışmalar kolesteatom dokusunda iyi bilinen bir apopitotik protein olan p53 seviyesinde değişiklik olmaksızın, FLICE benzeri antiapopitotik proteinin ve proliferasyon markerı ola Ki-67'nin önemli oranda arttığını göstermiştir(47, 61).

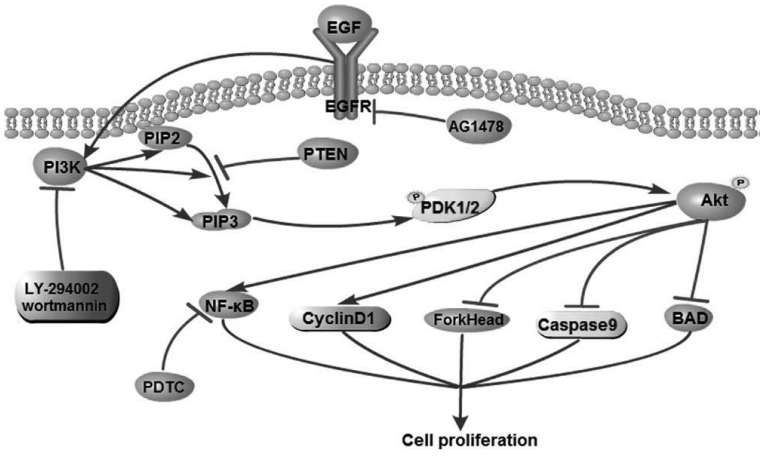
Apopitoz süreçlerinde bir diğer önemli mekanizmanın microRNA'lar olduğunu, edinilmiş kolesteatomda hücre proliferasyonunun bu mekanizma ile kontrol edildiğini Friedland ve ark.(62) 2009 yılındaki çalışmalarında göstermiştir. Kolesteatomdaki hücre proliferasyonu, invazyonu ve bozulmuş apopitoz sürecinden microRNA(miR)21'in upregulasyonunun sorumlu olduğu ortaya konulmuştur(62). Güncel bir çalışmada da buradan hareketle 7a microRNA'nın miR21'in down regulasyonu yoluyla apopitozu indüklediği keratinosit proliferasyonu ve invazyonunu inhibe ettiği ortaya konmuştur. Olası medikal tedavi çalışmaları için bu bulgu çok önemlidir(63).

2.1.7. Kolesteatom Hücre Proliferasyonundaki Sinyal Yolakları

Kolesteatom etyopatogenezinde görevli hücresel sinyal yolakların incelenmesi geliştirilecek olan alternatif tedavi protokolleri açısından yol gösterici olacaktır.

EGFR/PI3K/PKB Sinyal Yolağı

Kolesteatomdaki kronik enfeksiyöz süreçler sonucunda ortaya çıkan toksik ürünler EGFR/PI3K/PKB yolağını uyararak hücre proliferasyonu ve hayatta kalımı ile ilgili bir dizi kaskadı aktifleştirir(64). EGFR insan epitelyal tümörlerinde de ekspresyonu gösterilmiş; kolesteatomdaki hücresel proliferasyon ve farklılaşmada rolü olan bir reseptördür(65, 66). EGFR/PI3K/PKB yolağındaki aktivasyon ile fosforile olan protein kinaz B(PKB)-Akt programlı hücre ölümünden sorumlu *caspase 9* gibi apopitotik proteinleri inaktive ederek apopitozu engeller(67). Ayrıca NF- κB ve siklin D1 indüklenmesi ile hücre proliferasyonunu da uyarır(68). *Phosphatase and tensin homologue*(PTEN) bu yolağı baskılayan önemli bir tümör supresor gendir(69). Bu yolak üzerine yapılan çalışmalarda kolesteatom dokusunda normal dış kulak yolu epiteline göre EGFR, PKB, siklin D1, NF- κB seviyeleri yüksek olarak saptanmıştır. Tirozin kinaz reseptör ailesinden olan EGFR bu önemli yolağın ilk basamağında yer almaktadır(70). Buna ek olarak EGFR yolağını baskılayan PTEN geni ekspresyonu kolesteatom dokusunda azalmış olarak bulunmuştur(71). Bu yolağın AG1478 ve LY-294002 molekülleri ile inhibe edildiği güncel çalışmada, keratinositlerin proliferasyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir(72). Bu nedenlerle EGFR/PI3P/PKB yolağının inhibisyonu ilaç geliştirme çalışmalarında potansiyel hedeftir(72).

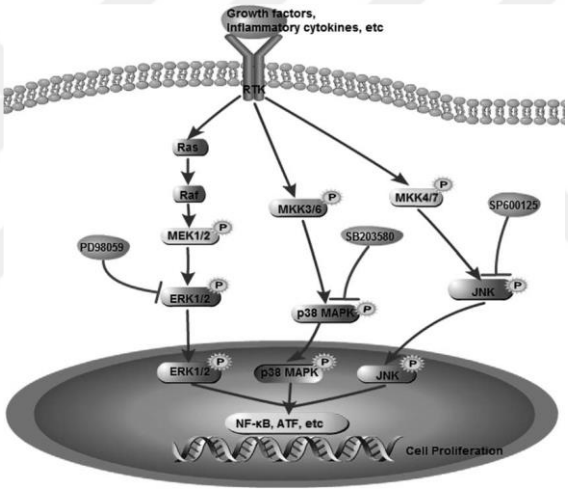


Şekil 2.2 : EGFR/PI3K/PKB Sinyal Yolağı

(Xie S, Xiang Y, Wang X, Ren H, Yin T, Ren J, et al. Acquired cholesteatoma epithelial hyperproliferation: roles of cell proliferation signal pathways. The Laryngoscope. 2016;126(8):1923-30.)

MAPK Sinyal Yolağı

MAPK sinyal yolağının hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşması gibi konularda önemli işlevleri bulunmaktadır. p38MAPK, *extracelluar signal-regulated kinase* (ERK)1/2 ve *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) MAPK süperailesinin en önemli üç üyesidir(13). Bu üç kinaz da inflamatuar sitokinler tarafından uyarıldıklarında NF-κB'yı indükleyerek hücre proliferasyonunu artırırlar(73-75). Huisman ve ark.(76-78) yaptığı 3 çalışmada kolesteatom epitelinde p38MAPK, ERK1/2'nin normal retroauriculer cilt epiteline göre yüksek ekspresyonu saptanmış, JNK düzeyleri ise normal bulunmuştur. Kolesteatoma yönelik medikal tedavi araştırmalarında p38MAPK ve ERK yolağına yönelik medikal tedavi araştırmaları da potansiyel tedaviler açısından umut verici olacaktır.



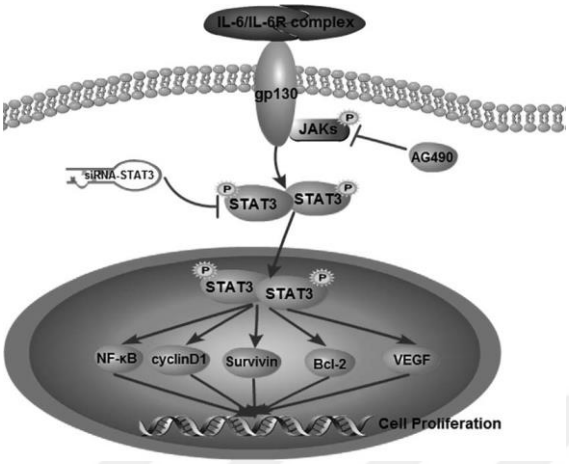
Şekil 2.3 : MAPK Sinyal Yolağı

(Xie S, Xiang Y, Wang X, Ren H, Yin T, Ren J, et al. Acquired cholesteatoma epithelial hyperproliferation: roles of cell proliferation signal pathways. The Laryngoscope. 2016;126(8):1923-30.)

IL-6/STAT3 Sinyal Yolağı

IL-6 *janus kinase*(JAK)/STAT yolağını uyaran en önemli proinflamatuar sitokindir. Bu aktivasyon sonucunda hücre içinde NF- κB, siklin D1 gibi maddeler indüklenerek hücre proliferasyonu artar. IL-6 ve STAT3 ekspresyonunun kolesteatom epitelinde normal dış kulak yolu epiteline göre yüksek olduğu gösterilmiştir(62, 79). Farklı kanserlerde IL-6/STAT yolağının inhibisyonu tedavi

umudu doğurmuştur, hücre çalışmalarında benign bir hastalık olan kolesteatom epitelinde de yüksek ekspresyonu saptanan bu yolak üzerine çalışmalar umut vadedecektir(13).

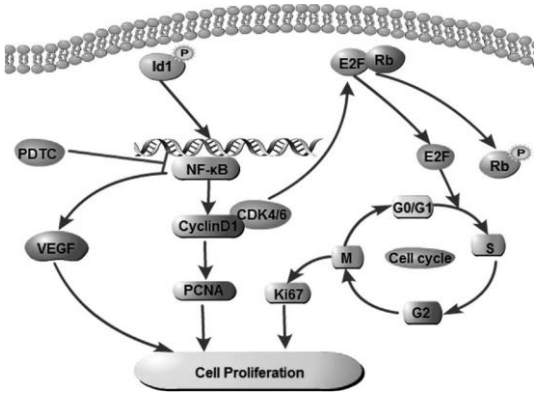


Şekil 2.4. IL-6/STAT3 Sinyal Yolağı

(Xie S, Xiang Y, Wang X, Ren H, Yin T, Ren J, et al. Acquired cholesteatoma epithelial hyperproliferation: roles of cell proliferation signal pathways. The Laryngoscope. 2016;126(8):1923-30.)

Id-1/ NF- κB/Siklin D1 Yolağı

Bu hücresel yolağın keratinosit hayatta kalımı ve proliferasyonunda önemli rol oynadığı farklı çalışmalarla kanıtlanmıştır, kolesteatom epitelinde de bu yolağın rolü gösterilmiştir(80, 81).



Şekil 2.5. : Id-1/ NF- κB/Siklin D1 Sinyal Yolağı

(Xie S, Xiang Y, Wang X, Ren H, Yin T, Ren J, et al. Acquired cholesteatoma epithelial hyperproliferation: roles of cell proliferation signal pathways. The Laryngoscope. 2016;126(8):1923-30.)

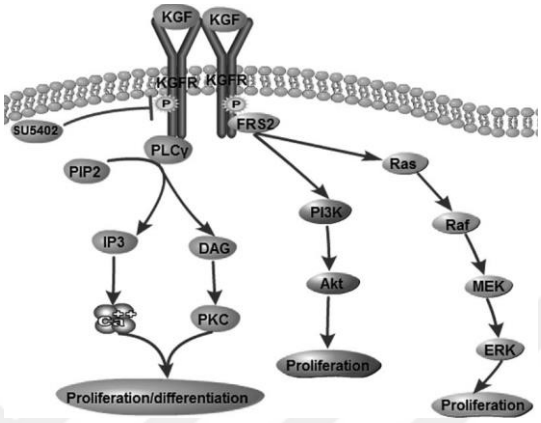
miRNA Aracılı Sinyal Yolağı

miRNA'lar kodlama yapmayan, mesajcı RNA'ları etkileyerek post-transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu düzenleyen moleküllerdir(82). miRNA21 disregulasyonu neoplastik ve hiperproliferatif hastalıklarda önemli bir patogenez basamağıdır(62). Friedland ve ark.(62) miRNA21'in edinilmiş kolesteatom epitelindeki proliferatif rolünü tanımladığından beri bu konu birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir. Friedland ve ark.(62) miRNA21'in kolesteatom epitelinde artmış ekspresyonunu ve buna bağlı azalmış PTEN gen ekspresyonunu normal dış kulak yolu cildi ile karşılaştırarak saptamıştır. Chen ve ark.(83, 84) yaptıkları çalışmalarda miRNA21 ve let7-miRNA arasındaki dengenin kolesteatomun benign hastalık doğasını oluşturduğunu belirtmiştir. Zhang ve ark.(63) da let7-miRNA'nın kolesteatomdaki hücre proliferasyonu ve invazyonunu durduğunu kanıtlamışlardır. Yapılan güncel çalışmalarda miRNA802 ve miRNA16-1-3p'nin de kolesteatom dokusunda arttığı, miRNA-10a-5p'nin belirgin oranda azaldığı gözlenmiştir(85, 86). Hücre proliferasyonunu artıran miRNA'lar PI3P/PKB yolağı ile NF- κB üzerinde proliferasyonu uyarıp, PTEN gibi tümör supresör genleri baskılamaktadır(86). miRNA'lar sadece kolesteatomdaki hücre proliferasyonunda değil kemik rezorbsiyonu ve osteoklast aktivasyonu gibi süreçlerde de önemli rol oynar. Kolesteatom dokusunda miRNA17 aracılı osteoklast aktivasyonu ve diferansiyasyonu olduğu gösterilmiştir(87). Güncel çalışmaların da yoğunlaştığı miRNA'lar kolesteatoma yönelik medikal tedavi seçenekleri açısından çok önemli birer potansiyel hedeftir.

KGF/KGFR Sinyal Yolağı

Keratinocyte growth factor (KGF) fibroblast growth faktör ailesine mensup hücre proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşmasında önemli bir moleküldür(88). KGF KGFR'e bağlanarak PI3P/PKB ve MAPK sinyal yolakları üzerinden hücre proliferasyonunu uyarır(89, 90). Yamamoto-Fukuda ve ark.(91, 92) kolesteatom epitelinde artmış KGF ekspresyonunun hücre proliferasyonuna ve diferansiyasyonuna etkisini hücre kültür çalışmasında göstererek bu yolağın önemini vurgulamıştır. Yamamoto-Fukuda ve ark.(93) bu bulgular ışığında selektif KGFR inhibitörü olan SU5402'yi rat modelinde kolesteatom hücrelerine uygulayarak

kolesteatom hücrelerinin proliferasyonunu durdurmuşlardır. Geçmişte kolesteatom üzerine medikal tedavi seçeneği olarak denenen topikal 5-FU da KGFR yolağını etkileyerek kolesteatom hücrelerinde KGF seviyelerini düşürüp proliferasyonu negatif yönde etkilemiştir(15). Bu nedenle KGF/KGFR yolağı ilaç geliştirme çalışmaları için bir diğer spesifik hedef olarak düşünülebilir.



Şekil 2.6. : KGF/KGFR Sinyal Yolağı

(Xie S, Xiang Y, Wang X, Ren H, Yin T, Ren J, et al. Acquired cholesteatoma epithelial hyperproliferation: roles of cell proliferation signal pathways. The Laryngoscope. 2016;126(8):1923-30.)

2.1.8. Kolesteatomun Medikal ve Cerrahi Tedavi Seçenekleri

Kolesteatom Cerrahi Tedavi Seçenekleri

Günümüzde kolesteatom tedavisinde küratif tek tedavi seçeneği cerrahi tedavidir. Cerrahi tedavinin amacı hastalıktan temizlenmiş, akıntısız, kuru bir kulak yaratmaktır(4).

Günümüz modern kolesteatom cerrahisinde ilk planda dış kulak yolu arka duvarının korunduğu *canal wall up*(CWU) timpanomastoidektomi prosedürleri tercih edilmektedir. Özellikle pnomotize mastoidlerde, östaki fonksiyonu iyi olan hastalarda, dış kulak yolu arka duvarı erode değilse ve tüm kolesteatom dokusu bu prosedürle çıkarılabilecekse bu teknik tercih edilmektedir. Anatomik ve fizyolojik yapıların korunması ile hızlı iyileşme, daha iyi işitme sonuçları bu tekniğin en önemli avantajlarıyken; beklenmeyen nüksler, ikinci bakı cerrahiler gerektirebilmesi

dezavantajlarıdır. Daha ileri ve yaygın kolesteatom vakalarında ise dış kulak yolu arka duvarının indirildiği *canal wall down*(CWD) timpanomastodektomi teknikleri uygulanır. Yaygın, komplikasyonlu veya dış kulak yolu arka duvarını erode eden kolesteatom vakalarında, tek işiten kulağın hastalıklarında, skleroze mastoid veya östaki disfonksiyonu durumunda, takibe gelemeyecek hastalarda bu prosedür uygulanmaktadır. Hastalık kontrolünü daha iyi sağlaması takiplerde nükslerin daha erken saptanması tekniğin en önemli avantajlarıyken; işitme sonuçlarının kötü olması, rekonstrüksiyon gerektirmesi, oluşan mastoid kaviteye bağlı hastanın hayat kalitesini düşürmesi ve mastoid hücrelerin yetersiz açılması, aşırı büyük kavite veya yetersiz meatoplasti nedeniyle akıntılı kulakların sık görülmesi bu tekniğin en önemli dezavantajlarıdır. Bu tekniklerde CWU'daki yüksek nüks oranları, CWD'deki akıntı problemleri bu tekniklerin modifikasyonları olan mastoid obliterasyonu, transkanal attikotomi, bondy mastoidektomi gibi teknikleri de ortaya çıkarmıştır(26).

Kolesteatom cerrahisinde son yıllarda endoskopi de sıklıkla kullanılmaktadır. Otoendoskopinin kolesteatom cerrahisinde en önemli avantajı klasik tekniklerle zor görülebilen sinüs timpani, fasiyal reses, attik bölge gibi anatomik alanlara hakimiyet sağlamasıdır. Endoskopik cerrahinin en önemli dezavantajı ise tek elle çalışma gerektirmesidir. Kombine cerrahilerin anatomik hakimiyeti artırması sebebiyle; mikroskobik, endoskopik veya mikroskobik/endoskopik yöntemlerde uzun dönem sonuçlarda avantaj sağladığı gösterilmiştir(5, 26, 94).

Kolesteatom Alternatif Medikal Tedavi Seçenekleri

Kolesteatom tedavisinde deneyimli cerrahlarda bile farklı oranlarda nükslerin görülmesi, araştırmacıları medikal tedavi araştırmalarına yönlendirmiştir(5, 6, 13). Yapılan tüm araştırmalara rağmen medikal tedavi olarak kullanıma girecek ideal molekül bulunamamıştır. Etyopatogeneze yönelik yapılan araştırmalar alternatif medikal tedavi seçenekleri oluşturulması için potansiyel hedefler doğurmuştur(13). Kolesteatomdaki skuamoz diferansiyasyon süreci ve epitelyal tümörlerle ortak sinyal yolaklarının olması epitelyal tümör tedavisindeki antitümöral ilaçların kolesteatom üzerine etkilerini araştırma konusu yapmıştır.

5-Florourasil (5-FU)

5-FU çok uzun yıllardır antikanser tedavisinde kullanılan bir ilaçtır(95). Sentetik bir pirimidin analoğu olan 5-FU timidilat sentaz inhibisyonu yaparak DNA ve RNA sentezini bozarak sitotoksik ve antiproliferatif etki gösterir(96). Bu sebeple 5-FU'in kolesteatom hücreleri üzerine etkileri birçok çalışmada incelenmiştir. Bu çalışmalarda 5-FU'nun kolesteatom hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve alternatif bir medikal tedavi seçeneği olabileceği gösterilmiştir(15, 16, 97). 1998 yılında Japon Otoloji Derneği yıllık toplantısında 5-FU'nin seçilmiş vakalarda kolesteatom hastalarına uygulanabileceği belirtilmiştir(98). Fakat 5-FU'nun sitotoksik etkileri nedeniyle yan etkileri üzerine daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır. Hayvanlar üzerine yapılan bir çalışmada bu ilacın ototoksik etkileri gösterilmiştir(17). Bu nedenlerle 5-FU üzerine daha fazla klinik çalışmaya ve kolesteatom etyopatogenezindeki spesifik yolakları hedefleyen moleküllerin araştırılmasına ihtiyaç vardır.

Siklosporin

Siklosporin temel olarak T lenfositler üzerinden etki gösteren, günümüzde doku transplantı ve psoriazis hastalarında kullanılan bir ajandır(99). Antijen sunucu hücre ve T hücre etkileşimi sonrasında T hücre reseptörü aktifleşir ve kalsiyum miktarı hücre içinde artar. Artan kalsiyum kalmoduline bağlanır ve bu kompleks kalsinörini aktive ederek T hücre nükleer faktör sitoplazmik kısmının (NFaTc) uyarımı ile inflamatuar sitokinlerin salnımına yol açar(99). Siklosporin siklofiline bağlanarak kalsinörin inhibisyonu yoluyla bu mekanizmayı bloklar. Siklosporin bu şekilde hem dermisteki lenfosit, makrofaj sayısını azaltır; hem de antijen sunucu hücre, T lenfosit aktivasyonunu bozar. Ayrıca keratinosit proliferasyonunu inhibe eder(99). Bu bilgilerden hareketle T lenfositler üzerinden osteoklast aktivasyonu ile kemik destruksiyonu görülen, keratinosit proliferasyonunun durdurulamadığı kolesteatom hücrelerinde siklosporin potansiyel bir tedavi molekülüdür. Bildiğimiz kadarıyla literatürde kolesteatom hücrelerinde siklosporinin etkileri üzerine bir çalışma bulunmamaktadır.

Takrolimus

Oral takrolimus transplant hastalarında uzun yıllardır kullanılırken, topikal takrolimus da atopik dermatit gibi hastalıkların tedavisine kullanılmaktadır. Takrolimus makrofiline bağlanarak kalsinörün inhibisyonu ile siklosporine benzer bir etki ile inflamasyonu, epidermal antijen sunucu hücrelerin aktivasyonunu durdurur(100). Siklosporinden farklı moleküle bağlanarak etki gösteren bu molekül de kolesteatom da potansiyel bir tedavi molekülüdür. Bildiğimiz kadarıyla literatürde kolesteatom hücelerine yönelik takrolimusun etkileri üzerine çalışma bulunmamaktadır.

İmiquimod

İmiquimod; bazal hücreli karsinom, skuamoz hücreli karsinom, skuamoz hiperplazi, herpes enfeksiyonları tedavisinde kullanılan güçlü antiviral ve antitümöral etkinliği olan bir ajandır(101). İmiquimod temel etkisini TLR-7 üzerinden NF- κB aktivasyonu ile proinflamatuar sitokinleri ve immun cevabı uyararak gösterir(102). Bunun tersine imiquimod terapotik fakat yüksek konsantrasyonlarda adenozin reseptörü üzerinden apopitotik etki göstererek hücre proliferasyonunu durdurur. İmiquimod molekülünün başlattığı inflamatuar mekanizma sonucunda negatif feedback ile apopitozu indüklediği ve bu yolla tümöral hücrelerde sitotoksik etki gösterdiği izlenmiştir(103, 104). İmiquimodun bu apopitotik etkisi kolesteatom hücrelerinde önemli bir yolak olan NF- κB yolağını baskılayarak potansiyel tedavi umudu olacağı düşünülmektedir. Literatürde dermatolojik hastalıklarda keratinositler üzerine etkileri araştırılan imiquimod ile ilgili kolesteatoma yönelik çalışma bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi (ESOGUTF) Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. 05.06.2018 tarih ve 07 karar numaralı ESOGUTF Girişimsel Olmayan Etik Kurul izni ile çalışmaya başlanmıştır. Çalışmada; kolesteatom nedeniyle timpanomastoidektomi operasyonu yapılan 3 hastadan kolesteatom dokusu elde edilerek hücre kültürü oluşturulmuştur. Çalışmaya katılan her hastadan aydınlatılmış onam formu alınıştır. Alınan kolesteatom dokuları ile ESOGUTF Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda in vivo hücre kültürü oluşturulmuştur. Çalışmanın bütçesi; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Destek Projesi ile karşılanmıştır.

3.1.Deney Planı

Çalışmada; ESOGUTF Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'na kulak akıntısı, işitme kaybı şikayetleri ile başvuran hastalar incelendi. Muayene ve klinik bulguları kolesteatom ile uyumlu olan ve temporal kemik-difüzyon manyetik rezonans görüntülemesi (MRG) kolesteatom olarak raporlanarak timpanomastoidektomi cerrahisi planlanan, 18 yaşından büyük 3 hasta çalışmaya dahil edildi. Genel anestezi altında timpanomastoidektomi operasyonu yapılan bu 3 hastadan elde edilen kolesteatom dokuları streptomisin-penisilin içeren *Hank's balanced salt solution* (HBSS) solüsyonu içerinde Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na taşındı. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında alınan örneklerden doku kültürü oluşturulmak üzere gerekli metodlar uygulandı. Ayrıca HEKa hazır hücre dizileri de kültüre edildi. Oluşturulan doku ve hücre kültürlerine kolesteatom etyopatogenezindeki muhtemel yolakları bloklayan 5-FU, siklosporin, takrolimus, imuquimod ilaçları uygun dozlarda uygulandı. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) testleri ile sitokin ölçümleri, hücre canlılık testleri yapılarak alternatif medikal tedavi seçenekleri ve etyopatogenezdeki moleküler yolaklar araştırıldı.

3.1.1. Kolesteatom Dokusu Elde Edilmesi ve Transportu

18 yaşından büyük, muayene, klinik bulguları kolesteatom ile uyumlu olan ve temporal kemik-difüzyon manyetik rezonans görüntülemesi (MRG) kolesteatom olarak raporlanarak genel anestezi altında timpanomastoidektomi operasyonu yapılan 3 hastadan kolesteatom dokuları elde edildi. Sağlanan numuneler vakit kaybetmeden streptomisin-penisilin içeren 5 ml (HBSS) içerisinde Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına nakledildi.

3.1.2. Kolesteatom Doku Kültürü ve HEKa Hücre Kültürü Oluştrulması

Transportu sağlanan dokular parçalanarak küçültüldü. İki kez HBSS ile yıkanıp, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüje tabi tutuldu. Kolesteatom dokuları, makasla daha küçük parçalara kesilip, kollojenaz/dispaz solüsyonunda yaklaşık 1 saat 37°C'de tutularak hücrelerin ayrışması sağlandı(105). Daha sonra enzimi inaktif hale getirmek için %2'lik *fetal bovin serum* (FBS) (Biological Industries Kat. No. 04-007-1B) kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi *phospate buffered saline* (PBS) ile muamele edildi. 1200 g 5 dk santrifüj sonrası üst kısım atılarak üzerine FBS'siz PBS konarak 1200 g 5 dk santrifüj edildi. Üst kısım atılarak % 0.25 Tripsin (Biological Industries Kat. No.03-053-1B) ile pipetaj yapılarak muamele edilip %2' lik FBS'li ve kalsiyum içeren PBS eklenip 1200 g 5 dk santrifüj edildi. Üst kısım atılarak alttaki hücreler 1 ml besiyeri içinde homojen hale getirilerek bir kısmı dondurma besiyerinde (%10 *dimetil sulfoksit*-DMSO, %90 FBS) - 80°C'de saklandı. Geri kalanı ise hücre kültür flaskına aktarılarak kültüre edildi. Kolesteatom keratinositlerini çoğaltmak için FBS ve 5 mg/mL gentamicin ve amfoterisin keratinosit serum free medium kullanıldı. Hazır keratinosit hücre dizisi (HEKa) %10 Fetal Bovine Serum içeren *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) içerisinde, 37°C, % 5 CO_2 içeren inkübatörde nemlendirilmiş atmosferde inkübe edildi (103). Tüm hücreler deney öncesinde çoğaltılarak stoklama işlemleri yapıldı. Canlılığın belirlenmesi için Tripan Blue yöntemi kullanıldı. Hücreler tripsinlenerek flask tabanından kaldırıldı ve sonra 10 µl tripan blue (Gibco, UK) boyasıyla 10 µl hücre örneği karıştırıldı. JuLI™ Br (Nanoentek Inc. Seul, Kore) kiti içerisinde bulunan

slayta aktarıldı. Sonuçlar JuLI™ Br cihazında analiz edilerek % olarak canlı hücreler belirlendi.(Resim 3.1.)



Resim 3.1.: JuLI™ Br Cihazı

Kontrol hücre kültüründe kullanılan HEKa hücreleri insan cilt epitelinden elde edilen hazır keratinosit hücreleriydi. Hücrelerin kültür işlemi için dondurucudan bir adet keratinosit büyüme kiti *(Keratinocyte Growth Kit)* ve dermal hücre bazal ortamı-485ml*(dermal cell bazal medium)* alındı. Tüm büyüme kiti bileşen şişelerinin ve bazal ortam şişesinin dış yüzeyleri otoklavda sterilize edildi. Kullanılan tüm malzemelerin steril olmasına dikkat edildi. Büyüme kiti bileşenleri bazal ortama eklenmeden hemen önce çözüldü. L-glutamin bileşeni 37 ° C su banyosunda ısıtıldı ve çalkalanarak homojenizasyonu sağlandı. Aseptik teknik kullanılarak ve biyogüvenlik kabini içinde çalışılarak, her bir büyüme kiti bileşeninin Tablo 3.1.2'de belirtilen hacmi, her transfer için ayrı bir steril pipet ile bazal ortam şişesine aktarıldı. Oluşturulan büyüme ortamı şişesinin kapağı sıkıca kapatıldı, etiketlendi, tarih atıldı ve 2-8 ° C sıcaklıkta saklanmak üzere buzdolabına konuldu.

Tablo 3.1. Keratinosit Büyüme Kiti Bileşenleri

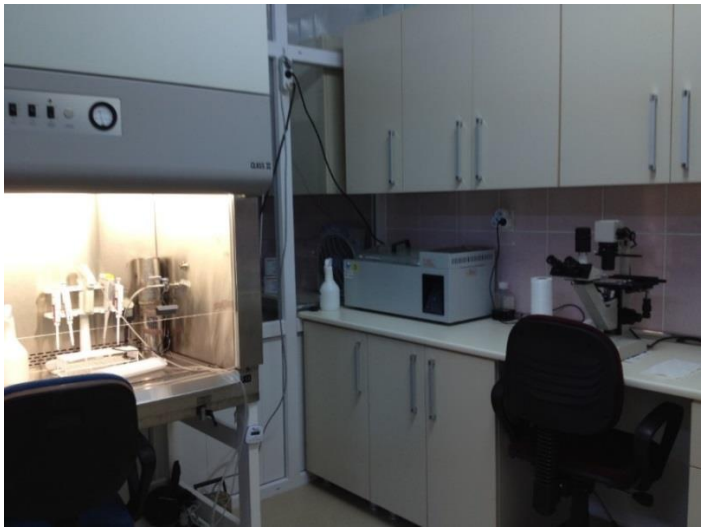
İçerik	Hacim	Son Konsantrasyon
Bovine Pituitary Extract (BPE)	2.0 mL	0.4%
rh TGF-a	0.5 mL	0.5 ng/mL
L-Glutamine	15.0 mL	6 mM
Hydrocortisone Hemisuccinate	0.5 mL	100 ng/mL
rh Insulin	0.5 mL	5 mg/ml
Epinephrine	0.5 mL	1.0 mM
Apo-Transferrin	0.5 mL	5 mg/ml

Kültür %70-80 hücre yoğunluğuna ulaştığında normal keratinosit pasajlanmasına geçildi. Birincil hücreler için Tripsin-EDTA (ATCC PCS-999-003) ve Tripsin Nötrleştirici Solüsyonu (ATCC PCS-999-004) ayrışmadan önce oda sıcaklığına ısıtıldı. Hücreler ile kullanımdan önce tam büyüme ortamı da 37 ° C'ye ısıtıldı. Her flask için, tek tabakaya(monolayer) zarar vermeden dikkatlice aspirasyon yapıldı. Kalıntı ortamı çıkarmak için hücre katmanı bir kez 3-5 mL D-PBS (ATCC 30-2200) ile durulandı. Her flaska önceden ısıtılmış tripsin-EDTA çözeltisi (her 25 cm^2 için 1-2 mL) eklendi. Tripsin-EDTA çözeltisinin hücrelerin üzerinde tam kaplama sağlaması için flask yavaşça sallandı, sonrasında tek tabakalı fazla sıvı aspire edildi. İnverted mikroskop altında incelenen flasktaki hücreler ayrılmaya başladığında hızlıca her bir flaska hızla eşit miktarda Tripsin Nötralize Edici Solüsyon (ATCC PCS-999-004) eklendi. Ayrılmış hücreler steril bir santrifüj tüpüne

aktarıldı. Geride kalmış olabilecek hücreleri toplamak için doku kültürü flaskına 3-5 mL D-PBS (ATCC 30-2200) eklendi. D-PBS/hücre karışımı Tripsin EDTA/ayrılmış hücre içeren steril santrifüj tüpüne alındı. 3 ila 5 dakika boyunca 150 x g'de santrifüjlendi. Sonrasında nötrleşme solüsyonu aspire edildi ve kalan hücreler yeni hazırlanarak ısıtılmış büyüme ortamına alındı. Hücreler sayıldı ve cm^2 başına 2.500 ila 5.000 hücre yoğunluğunda yeni kültür flaskları oluşturuldu. Hücreler 48 saat boyunca 37°C, % 5 CO_2'de inkübe edildi (Resim 3.2., Resim 3.3, Resim 3.4.).



Resim 3.2. Kültür Aşamalarının Gerçekleştirildiği İnkübatör ve İnverted Mikroskop



Resim 3.3. Ekim ve Pasajlama İşlemlerinin Gerçekleştirildiği Laminar Kabin (Class II), Su Banyosu, İnverted Mikroskop



Resim 3.4. Kabinde Pasajlama İşlemi

3.1.3 Çalışma Grupları

Timpanomastoidektomi operasyonu ile 3 hastadan elde edilen kolesteatom dokuları hücre kültür yöntemleri ile çoğaltılarak 11 ana grup, alt gruplarla birlikte 87 grup oluşturulmuştur.

Grup 1: 5-FU Uygulanan Hücreler(n:9): Bu grup hücrelere düşük, orta ve yüksek doz olmak üzere 3 dozda 5-FU uygulanmış, bu uygulamalar hücrelere 3'er kez yapılmış, toplamda 9 alt gruba ayrılmış ve 48.saat sonunda ilgili ölçümleri yapılmıştır.

Grup 2: Siklosporin Uygulanan Hücreler(n:9): Bu grup hücrelere düşük, orta, yüksek doz olmak üzere 3 dozda siklosporin uygulanmış, bu uygulamalar hücrelere 3'er kez yapılmış, toplamda 9 alt gruba ayrılmış ve 48.saat sonunda ilgili ölçümleri yapılmıştır.

Grup 3: Takrolimus Uygulanan Hücreler(n:9): Bu grup hücrelere düşük, orta, yüksek doz olmak üzere 3 dozda takrolimus uygulanmıştır, bu uygulamalar

hücrelere 3’er kez yapılmış, toplamda 9 alt gruba ayrılmış ve 48.saat sonunda ilgili ölçümleri yapılmıştır.

Grup 4: İmiquimod Uygulanan Hücreler(n:12): Bu grup hücrelere düşük, orta, yüksek ve çok yüksek doz olmak üzere 4 dozda imiquimod uygulanmıştır, bu uygulamalar hücrelere 3’er kez yapılmış, toplamda 12 alt gruba ayrılmış ve 48.saat sonunda ilgili ölçümleri yapılmıştır.

Grup 5: Kolesteatom Hücreleri Kontrol Grubu(n:3): Bu gruptaki kolesteatom hücrelerine hiçbir ilaç uygulanmamış olup 3 grup olarak ölçümleri yapılmıştır.

Grup 6: Kolesteatom Hücreleri 48. Saat Kontrol Grubu(n:3): Bu gruptaki kolesteatom hücrelerine hiçbir ilaç uygulanmamış olup 48.saat sonunda 3 grup olarak ölçümleri yapılmıştır.

Grup 7: HEKa Hücreleri 48. Saat Kontrol Grubu(n:3): Bu gruptaki hazır keratinosit hücreleri sağlıklı hücreler olarak hiçbir ilaç uygulanmadan 48. Saat sonunda 3 grup olarak ölçümleri yapılmıştır.

Grup 8: 5-FU Uygulanan HEKa Hücreleri Grubu (n:9): Bu grup hücrelere düşük, orta ve yüksek doz olmak üzere 3 dozda 5-FU uygulanmış, bu uygulamalar hücrelere 3’er kez yapılmış, toplamda 9 alt gruba ayrılmış ve 48.saat sonunda ilgili ölçümleri yapılmıştır.

Grup 9: Siklosporin Uygulanan HEKa Hücreleri Grubu (n:9): Bu grup hücrelere düşük, orta, yüksek doz olmak üzere 3 dozda siklosporin uygulanmış, bu uygulamalar hücrelere 3’er kez yapılmış, toplamda 9 alt gruba ayrılmış ve 48.saat sonunda ilgili ölçümleri yapılmıştır.

Grup 10: Takrolimus Uygulanan HEKa Hücreleri Grubu (n:9 Bu grup hücrelere düşük, orta, yüksek doz olmak üzere 3 dozda takrolimus uygulanmıştır, bu uygulamalar hücrelere 3'er kez yapılmış, toplamda 9 alt gruba ayrılmış ve 48.saat sonunda ilgili ölçümleri yapılmıştır.

Grup 11: İmiquimod Uygulanan HEKa Hücreleri Grubu(n:12): Bu grup hücrelere düşük, orta, yüksek ve çok yüksek doz olmak üzere 4 dozda imiquimod uygulanmıştır, bu uygulamalar hücrelere 3'er kez yapılmış, toplamda 12 alt gruba ayrılmış ve 48.saat sonunda ilgili ölçümleri yapılmıştır.

3.1.4. İlaçların Hücrelere Uygulanması

Kolesteatom keratinositleri ve HEKa hücreleri Tripan blue ile boyanıp, sayılarak ayrı tabakalar üzerinde 2 x 10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 5 gün boyunca kültüre edildi. Böylece primer kolesteatom keratinositleri ve HEKa hücreleri kullanılarak iki alternatif model geliştirildi. Kontrol grubunu oluşturacak hücreler kolesteatom örnekleri ile hazır keratinosit hücre dizisi (HEKa) kullanılarak hazırlandı(103). Deney aşamasına alınan keratinosit hücrelerinde skuamoz diferansiyasyonu ve proliferasyonu inhibe edebileceği düşünülen imiquimod (5-20 µg/ml) ve çok yüksek doz olarak 50 µg/ml, takrolimus (10^{-10} -10^{-6}M), siklosporin (0,3-10 µg/ml) ve 5-florourasil (10-25 µg/ml) değişken konsantrasyonlarda uygulanmıştır(103, 106-108). İlaç gruplarında sitokin düzey ölçümleri ve canlılık yüzdeleri 48. saatte ölçülerek değerlendirilmiştir.

3.1.5. Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi ve Canlılık Ölçümleri

Deneyler boyunca kuyucuklara alınacak hücrelerin sayısını belirlemek için, önceden çoğaltılan hücreler Tripan blue ile boyandı ve böylece boyanan-boyanmayan hücreler thoma lamında sayıldı. Elde edilen canlı hücre oranına göre hücrelerin sayısı hesaplanarak kuyucuklara aktarıldı. Yine tüm deney aşamalarından önce belirlenen absorbansın kaç hücreye denk geldiğini belirlemek amacıyla standart eğrilerin elde edilmesi için çeşitli sayılarda (0, 750, 1500, 3000, 6000, 12000, 24000

ve 48000 adet) hücre 96 kuyucuklu plakalara ekilerek absorbans değerleri belirlendi. Böylece oluşturulan standart eğri absorbansların hücre sayısı açısından karşılığını hesaplandı. Proliferasyonu belirlemek üzere hücreler 96 kuyucuklu plakalarda kuyucuk başına $2x10^4$ hücre olacak şekilde aktarılıp inkübasyon sonrası XTT proliferasyon kit prosedürü uygulandı. 450nm'de ELISA cihazı ile hücrelerin absorbansı ölçüldü. Hücrelerde IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF-α ve Ki-67 belirlemek üzere analizler yapıldı. Bu belirleme işlemleri için çeşitli ELISA kitleri kullanıldı, ELISA kit prosedürleri uygulandı. Kültür süpernatantlarındaki IL, Ki-67 ve TNF-α seviyeleri, üreticinin talimatlarına göre ticari insan IL, Ki-67 ve TNF-α enzim bağlantılı immünosorbent test (ELISA) test kitleri kullanılarak analiz edildi. Bunun için kit prosedüründe belirtilenlere uygun şekilde hücreler kuyucuklara eklendi. Üzerine denge solüsyonu, konjugat solüsyonu eklenerek, karıştırılıp kit içinde bulunan yapışkan şeritle kapatılarak belirtilen şekilde inkübe edildi. Kit içinde bulunan konsantre yıkama solüsyonu ile yıkama işlemi uygulandı. Her yıkama işleminden sonra kuyucuklardan sıvı çekilerek sıvının kuyucuklardan tamamen ayrılması için kurutma kâğıdına hafifçe vurularak sıvı kalmaması sağlandı. Kuyucuklara substrate A ve substrate B solüsyonları eklenerek inkübe edildi. Sonra durdurma solüsyonu eklenip 450 nm'de ELISA okuyucu ile absorbans değerleri okundu. Hesaplamalar için standart yüklenen kuyucuklardaki değerlerden oluşturulan standart eğri kullanıldı.

3.1.6. İstatistiksel Analiz

Sürekli değişkenlerin gruplar arasındaki karşılaştırılmasında ANOVA analizi kullanıldı. Değişkenlerin gruplara göre normal dağılıp dağılmadığı Shapiro-Wilk testi ile homojen varyansa sahip olup olmadığı Levene testi ile değerlendirildi. Homojen varyansa sahip değişkenlerin gruplar arası ikili karşılaştırılmasında Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Homojen varyansa sahip olmayan değişkenlerin çoklu karşılaştırılmasında ise Games-Howell testi kullanıldı. P değeri 0.05'den küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm analizler JASP 0.11.1 paket programı kullanılarak yapıldı.

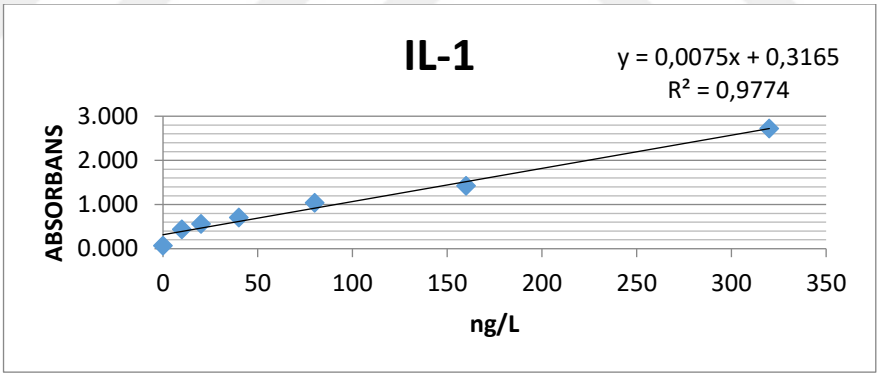
4.BULGULAR

Deney sırasında interlökin seviyelerinin doğru ölçümü ve laboratuvar standardizasyonunun sağlanması için; absorbans ve ng/l-ng/mL cinsinden interlökin seviyeleri arasındaki ilişki hesaplandı. Bu ilişki sonucunda absorbans ve sitokin seviyelerinin hesaplanmasında kullanılacak formül oluşturulmuştur. Standart belirlenmesi için bakılan absorbans ve sitokin düzeyleri arasındaki ilişkiler Tablo 4.1, Şekil 4.1, Tablo 4.2, Şekil 4.2, Tablo 4.3, Şekil 4.3, Tablo 4.4, Şekil 4.4, Tablo 4.5, Şekil 4.5, Tablo 4.6, Şekil 4.6'da verilmiştir.

4.1. IL-1 Standart (Std) Tablo ve Grafiği

Tablo 4.1: Absorbans – IL-1 Düzeyi (ng/L) İlişkisi Tablosu

Standart	STD6	STD5	STD4	STD3	STD2	STD1	BLANK
IL-1 Düzeyi (ng/L)	**320**	**160**	**80**	**40**	**20**	**10**	**0**
Absorbans	2,722	1,419	1,037	0,704	0,560	0,439	0,068

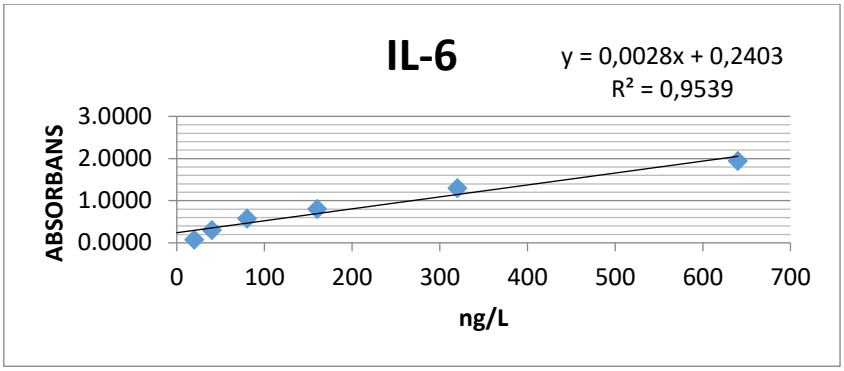


Şekil 4.1: Absorbans – IL-1 Düzeyi (ng/L) İlişkisi Grafiği

4.2. IL-6 Standart (Std) Tablo ve Grafiği

Tablo 4.2: Absorbans – IL-6 Düzeyi (ng/L) İlişkisi Tablosu

Standart	STD6	STD5	STD4	STD3	STD2	STD1	BLANK
IL-6 Düzeyi (ng/L)	**640**	**320**	**160**	**80**	**40**	**20**	**0**
Absorbans	2,8201	1,9440	1,2965	0,8080	0,5750	0,3050	0,079

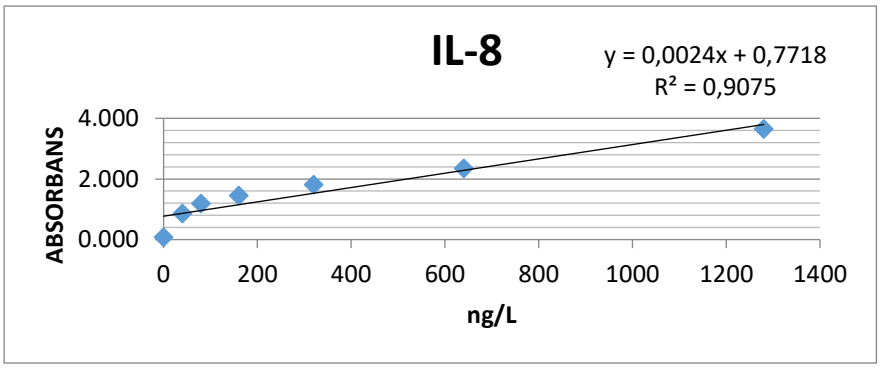


Şekil 4.2: Absorbans – IL-6 Düzeyi (ng/L) İlişkisi Grafiği

4.3. IL-8 Standart (Std) Tablo ve Grafiği

Tablo 4.3: Absorbans – IL-8 Düzeyi (ng/L) İlişkisi Tablosu

Standart	STD6	STD5	STD4	STD3	STD2	STD1	BLANK
Il-8 Düzeyi (ng/L)	**1280**	**640**	**320**	**160**	**80**	**40**	**0**
Absorbans	3,645	2,343	1,810	1,447	1,179	0,856	0,076

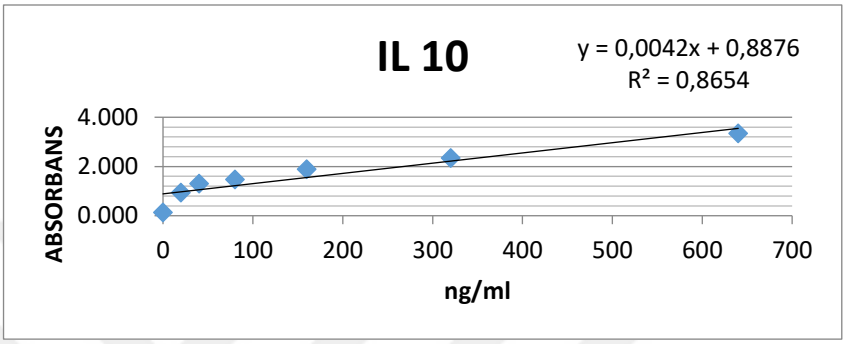


Şekil 4.3: Absorbans – IL-8 Düzeyi (ng/L) İlişkisi Grafiği

4.4. IL-10 Standart (Std) Tablo ve Grafiği Tablo

Tablo 4.4: Absorbans – IL-10 Düzeyi (ng/mL) İlişkisi Tablosu

Standart	STD6	STD5	STD4	STD3	STD2	STD1	BLANK
IL-10 Düzeyi (ng/L)	**640**	**320**	**160**	**80**	**40**	**20**	**0**
Absorbans	3,352	2,348	1,889	1,479	1,300	0,945	0,139

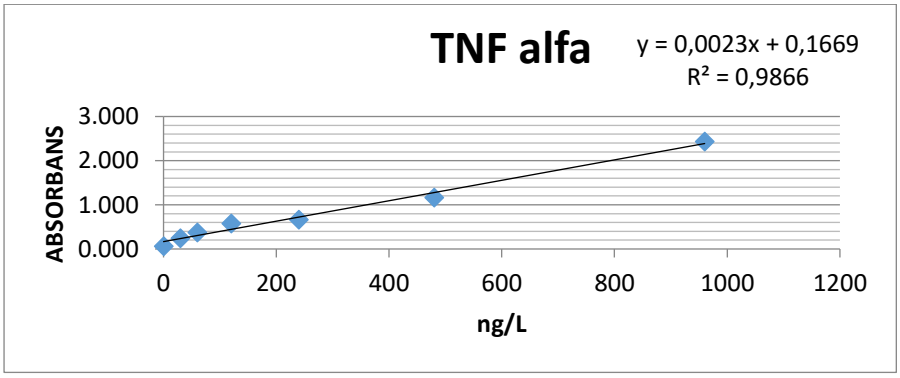


Şekil 4.4: Absorbans – IL-10 Düzeyi (ng/mL) İlişkisi Grafiği

4.5. TNF- α Standart (Std) Tablo ve Grafiği

Tablo 4.5: Absorbans – TNF- α Düzeyi (ng/L) İlişkisi Tablosu

Standart	STD6	STD5	STD4	STD3	STD2	STD1	BLANK
TNF-α Düzeyi (ng/L)	**960**	**480**	**240**	**120**	**60**	**30**	**0**
Absorbans	2,437	1,164	0,667	0,578	0,381	0,248	0,066

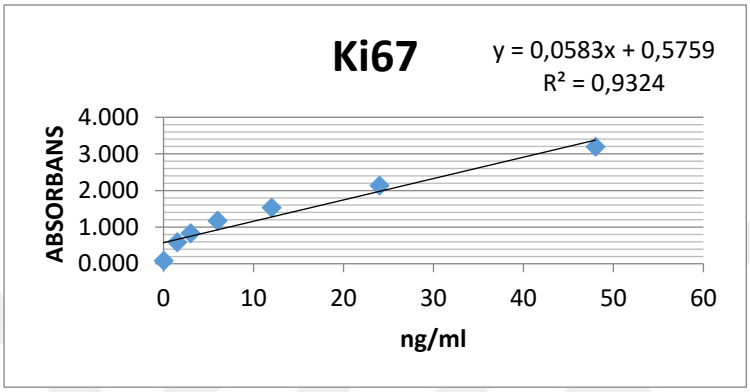


Şekil 4.5: Absorbans – TNF-α Düzeyi (ng/L) İlişkisi Grafiği

4.6. Ki67 Standart (Standart) Tablo ve Grafiği

Tablo 4.6: Absorbans – Ki67 Düzeyi (ng/mL) İlişkisi Tablosu

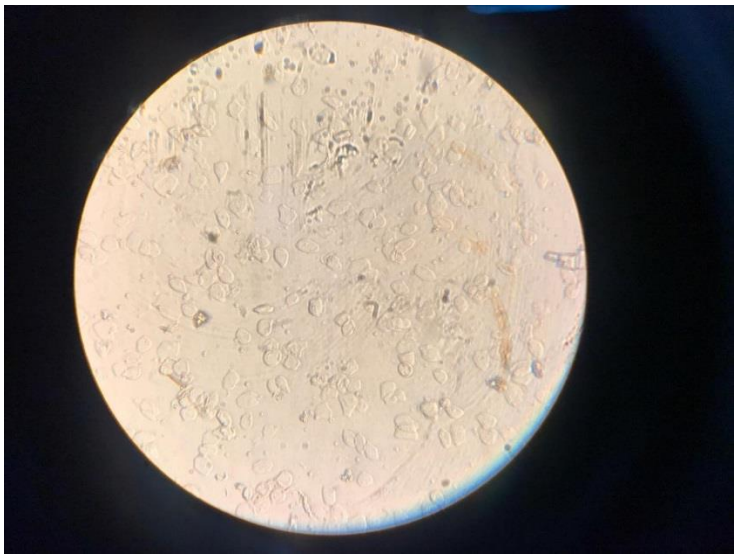
Standart	STD 6	STD 5	STD 4	STD 3	STD 2	STD 1	BLANK
Ki67 Düzeyi (ng/mL)	**48**	**24**	**12**	**6**	**3**	**1.50**	**0**
Absorbans	3,198	2,138	1,5311	1,1754	0,8325	0,5899	0,080



Şekil 4.6: Absorbans – Ki67 Düzeyi (ng/mL) İlişkisi Grafiği

4.7. Hücre Kültürü Bulguları

Hücre kültüründe tutunmanın sağlandığı ve flaska tutunmuş kolesteatom hücreleri Resim 4.1'de gösterilmiştir.



Resim 4.1. Primer kolesteatom dokularına ait keratinosit kültürü

4.8. Grupların Sitokin Düzeyleri Ölçümü

Elde edilen standart eğrilere göre sitokin ölçümleri gruplara göre uygulandı.

4.8.1. IL-1 Sitokin Düzeyleri

IL-1 için her grubun ortalama sitokin düzeyleri, standart sapmaları Tablo 4.7.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. IL-1 Sitokin Düzeyleri Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Gruplar	Mean	SD	N
İmiquimod 10 µg/ml	53,70	2,36	3
İmiquimod 20 µg/ml	90,63	1,79	3
İmiquimod 50 µg/ml	6,00	0,62	3
İmiquimod 5 µg/ml	35,40	0,85	3
5-florourasil 10 µg/ml	80,30	2,04	3
5-florourasil 15 µg/ml	92,53	1,92	3
5-florourasil 25 µg/ml	63,97	1,07	3
HEKa İmiquimod 10 µg/ml	61,83	2,32	3
HEKa İmiquimod 20 µg/ml	54,23	2,76	3
HEKa İmiquimod 50 µg/ml	7,27	0,65	3
HEKa İmiquimod 5 µg/ml	70,97	1,76	3
HEKa 5-florourasil 10 µg/ml	1,57	0,29	3
HEKa 5-florourasil 15 µg/ml	21,03	1,57	3
HEKa 5-florourasil 25 µg/ml	1,83	0,72	3
HEKa Kontrol 48.Saat	175,23	5,57	3
HEKa Siklosporin 0,3 µg/ml	51,80	1,22	3
HEKa Siklosporin 10 µg/ml	36,10	0,87	3
HEKa Siklosporin 2 µg/ml	77,53	2,22	3
HEKa Takrolimus 10^{-10} M	8,50	0,70	3
HEKa Takrolimus 10^{-6} M	7,70	0,72	3
HEKa Takrolimus 10^{-8} M	5,07	0,42	3
Kolesteatom Kontrol	163,73	3,70	3
Kolesteatom Kontrol 48.Saat	171,80	4,12	3
Siklosporin 0,3 µg/ml	79,93	1,00	3
Siklosporin 10 µg/ml	69,57	0,90	3
Siklosporin 2 µg/ml	69,53	2,56	3
Takrolimus 10^{-10} M	71,93	2,81	3
Takrolimus 10^{-6} M	63,93	1,23	3
Takrolimus 10^{-8} M	77,47	1,91	3

Mean:Ortalama Sitokin Değeri, SD:Standart Sapma, N:Grup Sayısı

IL-1 sitokin düzeylerinin ortalama değerleri ve standart sapmaları ise Tablo4.7.'de verilmiştir. Kolesteatom hücreleri kontrol grubunda ortalama IL-1 düzeyi 163,73 ng/L; 48. saat ölçümünde ise 171,80 ng/L olarak ölçülmüştür. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur(p=0,7). Sağlıklı hücre olarak kontrol grubunu oluşturan HEKa 48.saat kontrol grubunda IL-1 düzey ortalaması 175,23 ng/L olarak saptanmıştır. Kolesteatom hücre kontrol grubu ve kolesteatom 48.saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında HEKa 48.saat kontrol grubunda IL-1 seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır(p=0,55 ve p=1,00). Uygulanan tüm ilaçlar hücre gruplarında IL-1 düzeylerini düşürmüştür. İmiquimod 50 µg/ml dozunda IL-1 düzey ortalamasını 6'ya düşürmüştür, kolesteatom hücrelerinde IL-1 düzeyini en çok düşüren ilaç imiquimod 50 µg/ml dozudur, bu durum tüm ilaç alt grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıdır(p<0,01). İmiquimod tüm doz gruplarında kolesteatom hücreleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-1 seviyelerini düşürmüştür(p<0,01). Normal hücreler üzerine olan etkileri incelendiğinde ise İmiquimod tüm doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde HEKa 48.saat kontrol grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-1 seviyelerini azaltmıştır(p<0,01). 5-FU ilacı uygulanan gruplar kendi içerisinde incelendiğinde; 5-FU 25 µg/ml dozunda en düşük IL-1 seviyeleri saptanmış olup kolesteatom hücreleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında bu sonuç da istatistiksel olarak anlamlıdır(p<0,01). 5-FU 25 µg/ml dozunda 10 ve 15 µg/ml'lik 5-FU dozlarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-1 düzeylerini daha fazla düşürmüştür(p<0,01). Düşük doz 5-FU grupları da kolesteatom hücre kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-1 düzeylerini düşürmüştür(p<0,01). 5-FU uygulanan tüm dozlarda IL-1 düzeylerini kolesteatom hücre kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürmektedir(p<0,01). Kolesteatom hücrelerinde yüksek dozda bu etkisi en güçlüdür. 5-FU'nın etkisi normal hücreler üzerinde ise daha belirgindir. Tüm gruplar içerisinde en düşük IL-1 düzeyi 5-FU 10 µg/ml dozunda 1,57 ve 5-FU 25 µg/ml dozunda 1,53 olarak ölçülmüştür. 5-FU tüm doz gruplarında HEKa 48.saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-1 seviyelerini azaltmıştır(p<0,01). 5-FU uygulanan HEKa hücreleri, aynı dozun uygulandığı

kolesteatom hücreleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde tüm alt gruplarda IL-1 seviyeleri daha düşük ölçülmüştür($p<0,01$). Siklosporin uygulanan kolesteatom hücreleri ilaç grupları incelendiğinde en düşük IL-1 seviyeleri 2 µg/ml dozunda saptanmıştır ve kolesteatom hücre kontrol gruplarına göre bu sonuç da istatistiksel olarak anlamlıdır($p<0,01$). 2 ve 10 µg/ml dozlarında IL-1 seviyeleri benzer izlenmiş ve bu dozlar arasında IL-1 seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur($p=1,00$). Tüm siklosporin ilaç grupları kolesteatom hücre kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-1 seviyelerini düşürmüştür($p<0,01$). Normal dokuya olan etkileri incelendiğinde de siklosporin tüm doz gruplarında HEKa 48.saat kontrol grubuna göre IL-1 düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır($p<0,01$). Takrolimus ilaç grupları da kolesteatom hücre kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-1 düzeylerini düşürmüştür($p<0,01$). Bu etki en belirgin olarak Takrolimus 10^{-6} M grubunda izlenmiştir, kolesteatom hücre kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-1 seviyeleri azalmıştır($p<0,01$). Takrolimusun normal hücreler üzerine olan etkisi çok daha belirgindir. HEKa 48.saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında takrolimus tüz dozlarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-1 düzeylerini azaltmıştır($p<0,01$). Takrolimus uygulanan HEKa hücreleri, aynı dozun uygulandığı kolestetaom hücreleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde tüm alt gruplarda IL-1 seviyeleri daha düşük ölçülmüştür($p<0,01$).

4.8.2. IL-6 Sitokin Düzeyleri

IL-6 için her grubun ortalama sitokin düzeyleri, standart sapmaları Tablo 4.8.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. IL-6 Sitokin Düzeyleri Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Gruplar	Mean	SD	N
İmiquimod 10 µg/ml	286,10	1,99	3
İmiquimod 20 µg/ml	465,17	4,06	3
İmiquimod 50 µg/ml	8,73	0,55	3
İmiquimod 5 µg/ml	450,67	6,90	3
5-florourasil 10 µg/ml	541,10	2,81	3
5-florourasil 15 µg/ml	359,13	1,60	3
5-florourasil 25 µg/ml	449,03	5,58	3

Tablo 4.8.'Devam' IL-6 Sitokin Düzeyleri Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

HEKa İmiquimod 10 µg/ml	638,87	2,46	3
HEKa İmiquimod 20 µg/ml	215,77	2,45	3
HEKa İmiquimod 50 µg/ml	3,93	0,23	3
HEKa İmiquimod 5 µg/ml	454,00	3,61	3
HEKa 5-florourasil 10 µg/ml	168,57	2,32	3
HEKa 5-florourasil 15 µg/ml	270,00	1,90	3
HEKa 5-florourasil 25 µg/ml	73,33	1,04	3
HEKa Kontrol 48.Saat	96,83	1,55	3
HEKa Siklosporin 0,3 µg/ml	209,43	2,96	3
HEKa Siklosporin 10 µg/ml	203,30	2,34	3
HEKa Siklosporin 2 µg/ml	146,93	3,15	3
HEKa Takrolimus 10^{-10} M	49,57	2,27	3
HEKa Takrolimus 10^{-6} M	120,37	0,71	3
HEKa Takrolimus 10^{-8} M	30,07	1,21	3
Kolesteatom Kontrol	251,53	5,54	3
Kolesteatom Kontrol 48.Saat	245,53	4,54	3
Siklosporin 0,3 µg/ml	282,27	2,75	3
Siklosporin 10 µg/ml	590,03	2,71	3
Siklosporin 2 µg/ml	371,87	6,30	3
Takrolimus 10^{-10} M	233,90	2,33	3
Takrolimus 10^{-6} M	233,73	5,00	3
Takrolimus 10^{-8} M	651,43	2,86	3

Mean:Ortalama Sitokin Değeri, SD:Standart Sapma, N:Grup Sayısı

IL-6 sitokin düzeylerinin ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo4.8.'de verilmiştir. Kolesteatom hücreleri kontrol grubunda ortalama IL-6 düzeyi 251,53 ng/L; 48.saat sonunda yapılan ölçümde ise 245,53 ng/L olarak saptanımıştır. HEKa 48.saat kontrol grubunda ise bu düzey 96,83 ng/L olarak ölçüldü. Kolesteatom hücreleri kontrol grubu ve kolesteatom 48.saat kontrol grubu ile HEKa 48.saat kontrol grubu bu açıdan karşılaştırıldığında IL-6 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı($p<0,01$). IL-6 düzeyi kolesteatom hücreleri kontrol gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek saptandı. İmiquimod ilaç grubu bu açıdan incelendiğinde yüksek doz ve düşük doz ilaç etkisi farklı izlendi. İmiquimod 5 ve 20 µg/ml dozlarında kolesteatom hücre kontrol gruplarına göre IL-6 düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdı($p<0,01$). İmiquimod 10 µg/ml dozunda ise IL-6 seviyeleri kolesteatom hücre kontrol grubuna

göre az da olsa yüksek izlendi; fakat bu yükseliş istatistiksel olarak anlamlı değildi(p=0,05). 48.Saat kolesteatom kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise bu yükseliş istatistiksel olarak anlamlıydı(p=0,02). İmiquimod 50 µg/ml dozunda ise tüm ilaç grupları ve kolesteatom hücre kontrol grupları ile karşılaştırıldığında IL-6 düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttı(p<0,01). İmiquimodun 5, 10 ve 20 µg/ml doz grupları HEKa 48.saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-6 seviyeleri yüksek olarak saptandı(p<0,01). İmiquimod 50 µg/ml dozunda ise HEKa 48. Saat kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-6 seviyeleri düşük olarak ölçüldü(p<0,01). 5-FU grupları incelendiğinde ise kolesteatom hücrelerine uygulanan tüm doz gruplarında IL-6 seviyeleri yükseldi, 3 doz grubu da kolesteatom hücreleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında bu durum istatistiksel olarak anlamlıydı(p<0,01). HEKa 48.saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde HEKa hücrelerine uygulanan 10 ve 15 µg/ml doz gruplarında IL-6 seviyeleri yüksek, 25 µg/ml doz grubunda ise düşük saptandı(p<0,01). Siklosporin grupları incelendiğinde tüm doz gruplarında IL-6 seviyeleri yükseldi. Bu durum 2 ve 10 µg/ml dozlarında tüm kolesteatom hücre kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0,01); 0,3 µg/ml dozunda ise kolesteatom hücre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi(p=0,05). 48.Saat kolesteatom hücreleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise bu yükseliş anlamlıydı(p=0,01). Siklosporin tüm doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde HEKa hücrelerinde, HEKa 48. saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IL-6 seviyelerini artırdı(p<0,01). Takrolimus 10^{-10} M doz grubunda kolesteatom hücre kontrol grubu ve 48. Saat kolesteatom grubu ile karşılaştırıldığında IL-6 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmadı(p=0,22 ve p=0,34). 10^{-8} M dozunda ise tüm kolesteatom hücre kontrol grupları ile karşılaştırıldığında IL-6 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı(p<0,01). 10^{-6} M doz grubu ile kolesteatom hücre kontrol grubu ve 48. saat kolesteatom kontrol grubu arasında yapılan karşılaştırmada; benzer izlenen IL-6 düzeyleri arasında istatistiksel olarak da anlamlı fark saptanmadı(p=0,26 ve p=0,53). HEKa 48. saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Takrolimus 10^{-10} M ve 10^{-8} M HEKa doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-6 seviyeleri

düşük saptandı($p<0,01$); 10^{-6} M HEKa doz grubunda ise IL-6 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı($p<0,01$).

4.8.3. IL-8 Sitokin Düzeyleri

IL-8 için her grubun ortalama sitokin düzeyleri, standart sapmaları Tablo 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4.8.3. IL-8 Sitokin Düzeyleri Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Gruplar	Mean	SD	N
İmiquimod 10 µg/ml	320,93	2,99	3
İmiquimod 20 µg/ml	359,43	3,10	3
İmiquimod 50 µg/ml	260,57	2,84	3
İmiquimod 5 µg/ml	362,80	2,07	3
5-florourasil 10 µg/ml	534,47	5,34	3
5-florourasil 15 µg/ml	401,57	1,65	3
5-florourasil 25 µg/ml	198,23	2,62	3
HEKa İmiquimod 10 µg/ml	420,63	5,28	3
HEKa İmiquimod 20 µg/ml	255,67	2,34	3
HEKa İmiquimod 50 µg/ml	26,13	0,71	3
HEKa İmiquimod 5 µg/ml	302,30	4,53	3
HEKa 5-florourasil 10 µg/ml	290,67	3,40	3
HEKa 5-florourasil 15 µg/ml	116,73	2,12	3
HEKa 5-florourasil 25 µg/ml	238,27	1,01	3
HEKa Kontrol 48.saat	350,17	4,82	3
HEKa Siklosporin 0,3 µg/ml	65,60	2,72	3
HEKa Siklosporin 10 µg/ml	4,20	0,46	3
HEKa Siklosporin 2 µg/ml	23,13	0,47	3
HEKa Takrolimus 10^{-10} M	160,03	2,82	3
HEKa Takrolimus 10^{-6} M	31,83	0,49	3
HEKa Takrolimus 10^{-6} M	119,67	3,15	3
Kolesteatom Kontrol	350,90	3,81	3
Kolesteatom Kontrol 48.Saat	261,63	0,91	3
Siklosporin 0,3 µg/ml	345,40	2,55	3
Siklosporin 10 µg/ml	208,50	1,18	3
Siklosporin 2 µg/ml	291,33	2,01	3
Takrolimus 10^{-10} M	318,30	2,26	3
Takrolimus 10^{-6} M	285,13	3,19	3
Takrolimus 10^{-8} M	376,73	3,29	3

Mean:Ortalama Sitokin Değeri, SD:Standart Sapma, N:Grup Sayısı, IL-8:İnterlökin 8

IL-8 sitokin düzeylerinin ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo4.9.'da verilmiştir. Kolesteatom hücreleri kontrol grubunda ortalama IL-8 düzeyi 350,9 ng/L; 48.saat sonunda ise 261,63 ng/L olarak saptanmıştır. Bu 2 grup arasındaki fark istatistiksel olarak da anlamlıdır($p<0,01$). HEKa 48.saat kontrol grubunda ise IL-8 düzeyi 350,17 ng/L olarak saptanmıştır, kolesteatom hücre kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu($p=1,00$). Fakat 48. saat kolesteatom hücre kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak IL-8 düzeyleri yüksek olarak saptandı($p<0,01$). İmiquimod 5 µg/ml dozunda IL-8 düzeyi kolesteatom hücre kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir($p=0,22$). Kolesteatom 48. saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise IL-8 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır($p<0,01$). İmiquimod 10 µg/ml dozunda kolesteatom hücre kontrol grubuna göre IL-8 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı($p=0,01$), Kolesteatom 48. saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise IL-8 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı($p<0,01$). İmiquimod 20 µg/ml dozunda kolesteatom hücre kontrol grubuna göre IL-8 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı fark göstermedi($p=0,54$), kolesteatom 48. saat kontrol grubuna göre ise IL-8 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gösterdi($p<0,01$). IL-8 seviyeleri İmiquimod 5, 10, 20 µg/ml gruplarında 48. saat kolesteatom hücre kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır($p<0,01$). İmiquimod 50 µg/ml grubu ile kolesteatom hücre kontrol grubu karşılaştırıldığında IL-8 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı($p<0,01$). Kolesteatom 48. saat grubu ile karşılaştırıldığında ise IL-8 seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı($p=1,00$); fakat IL-8 düzeyleri benzer izlendi. HEKa hücrelerinde imiquimodun etkileri incelendiğinde; İmiquimod 5, 20, 50 µg/ml doz gruplarında HEKa 48. saat kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-8 seviyeleri düşük olarak saptanmıştır($p<0,01$). 10 µg/ml doz grubunda ise IL-8 seviyeleri HEKa 48. saat kontrol grubuna göre yüksek saptanmıştır($p<0,01$). 5-FU ilaç grupları incelendiğinde 10 ve 15 µg/ml doz gruplarında tüm kolesteatom hücre kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-8 seviyeleri artış gösterdi($p<0,01$). 25 µg/ml doz grubunda ise tüm kolesteatom hücre gruplarına göre IL-8 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı($p<0,01$). 5-FU uygulanan tüm HEKa hücrelerinde, HEKa 48. saat kontrol

grubuna göre IL-8 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük izlenmiştir($p<0,01$). Siklosporin grubu incelendiğinde; 0,3 µg/ml doz grubu kolesteatom hücre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IL-8 seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı($p=0,85$). Kolesteatom hücreleri 48. saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise IL-8 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı($p<0,01$). Siklosporin 2 µg/ml grubu kolesteatom hücre kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-8 seviyeleri düşük olarak saptandı($p<0,01$). Kolesteatom 48. saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-8 seviyeleri yüksek olarak ölçüldü($p<0,01$). Siklosporin 10 µg/ml grubu ile tüm kolesteatom hücre kontrol grupları karşılaştırıldığında IL-8 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olarak saptandı($p<0,01$). Siklosporin uygulanan tüm HEKa hücre doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde HEKa 48. saat kontrol grubuna göre IL-8 seviyeleri düşük olarak saptanmıştır($p<0,01$). Takrolimus grupları incelendiğinde; 10^{-10} M doz grubu ile kolesteatom hücre kontrol grubu IL-8 düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, IL-8 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olarak saptandı($p=0,01$). Kolesteatom 48. saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise düzeyler istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu($p<0,01$). Takrolimus 10^{-8} M grubu ile kolesteatom kontrol grubu ve kolesteatom 48. saat kontrol grubu karşılaştırıldığında IL-8 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı($p=0,02$ ve $p<0,01$). Takrolimus 10^{-6} M grubu ile kolesteatom hücre kontrol grubu karşılaştrıldığında IL-8 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu($p<0,01$). Kolesteatom 48. saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise IL-8 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı($p=0,04$). Takrolimus uygulanan HEKa hücrelerinde tüm doz gruplarında HEKa 48.saat kontrol grubuna göre IL-8 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olarak saptanmıştır($p<0,01$).

4.8.4. IL-10 Sitokin Düzeyleri

IL-10 için ortalama sitokin düzeyleri, standart sapmalar Tablo 4.10.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.10. IL-10 Sitokin Düzeyleri Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Gruplar	Mean	SD	N
İmiquimod 10 µg/ml	278.33	3.89	3
İmiquimod 20 µg/ml	267.03	1.63	3
İmiquimod 50 µg/ml	166.83	0.76	3
İmiquimod 5 µg/ml	285.87	0.96	3
5-florourasil 10 µg/ml	265.70	2.96	3
5-florourasil 15 µg/ml	223.87	41.32	3
5-florourasil 25 µg/ml	165.27	4.74	3
HEKa imiquimod 10 µg/ml	264.57	2.56	3
HEKa imiquimod 20 µg/ml	235.07	3.29	3
HEKa imiquimod 50 µg/ml	59.57	0.74	3
HEKa imiquimod 5 µg/ml	285.47	4.51	3
HEKa 5-florourasil 10 µg/ml	268.47	5.80	3
HEKa 5-florourasil 15 µg/ml	222.30	3.94	3
HEKa 5-florourasil 25 µg/ml	138.43	2.89	3
HEKa Kontrol 48. saat	293.63	1.25	3
HEKa Siklosporin 0,3 µg/ml	249.50	3.94	3
HEKa Siklosporin 10 µg/ml	137.57	1.46	3
HEKa Siklosporin 2 µg/ml	184.80	2.88	3
HEKa Takrolimus 10^{-10} M	344.50	1.80	3
HEKa Takrolimus 10^{-6} M	186.17	3.49	3
HEKa Takrolimus 10^{-6} M	260.13	4.29	3
Kolestetaom Kontrol	301.63	3.73	3
Kolestetaom Kontrol 48. saat	333.33	1.80	3
Siklosporin 0,3 µg/ml	296.30	0.87	3
Siklosporin 10 µg/ml	240.57	3.80	3
Siklosporin 2 µg/ml	248.00	2.34	3
Takrolimus 10^{-10} M	268.67	5.59	3
Takrolimus 10^{-6} M	199.63	5.64	3
Takrolimus 10^{-8} M	190.77	6.55	3

Mean:Ortalama Sitokin Değeri, SD:Standart Sapma, N:Grup Sayısı

IL-10 sitokin düzeylerinin ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.10.'da verilmiştir. Kolesteatom hücreleri kontrol grubunda ortalama IL-10 düzeyi 301,63 ng/ml; kolesteatom 48. saat kontrol grubunda ise 333,33 ng/ml olarak saptandı, bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı(p=0,02). HEKa 48. saat kontrol grubunda ortalama IL-10 düzeyi 293,63 ng/ml olarak saptandı ve bu fark kolesteatom hücreleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildi(p=0,45). 48. saat kolesteatom kontrol grubuna göre ise istatistiksel olarak

anlamlı şekilde düşüktü($p<0,01$). Tüm ilaç grupları içinde IL-10 düzeyini en çok düşüren ilaçlar; 166,83 ng/ml ortalama değeri ile İmiquimod 50 µg/ml grubu ve 165,27 ng/ml ortalama değeri ile 5-FU 25 µg/ml grubu oldu. Bu düzey kolesteatom hücre kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı saptandı($p<0,01$). Bu 2 ilaç grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu($p=1,00$). İmiquimod grubu incelendiğinde 5 µg/ml doz grubu ile kolesteatom hücre kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı($p=0,13$). Kolesteatom 48. saat kontrol grubuna göre ise IL-10 seviyeleri statistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olarak saptandı($p<0,01$). 10 µg/ml doz grubu; kolesteatom hücre kontrol grubu ve kolesteatom 48.saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IL-10 seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı düşüş saptandı($p=0,04$ ve $p<0,01$). 20 µg/ml doz grubu kolesteatom hücre kontrol grubu ve kolesteatom 48. Saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-10 seviyeleri düşük saptandı($p=0,02$ ve $p<0,01$). İmiquimod 50 µg/ml dozu diğer imiquimod doz grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-10 seviyeleri daha düşük saptandı($p<0,01$). İmiquimod 50 µg/ml dozunda en güçlü etki ile IL-10 seviyesini azalttı. İmiquimod uygulanan HEKa hücreleri incelendiğinde 10, 20, 50 µg/ml doz gruplarında HEKa 48.saat kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-10 seviyeleri düşük olarak saptandı. 5 µg/ml HEKa doz grubunda ise IL-10 seviyesi azalmasına rağmen bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi($p=0,18$). 5-FU grubu incelendiğinde kolesteatom hücrelerinde imiquimod grupları gibi doz artıkça IL-10 seviyelerindeki azalma görülmektedir. 5-FU 10 µg/ml doz grubu ile kolesteatom hücre kontrol grubu ve kolesteatom 48. saat kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-10 seviyeleri düşük olarak saptandı($p<0,01$). 15 µg/ml doz grubu ile kolesteatom hücre kontrol grubu ve kolesteatom 48. saat kontrol grubu karşılaştırıldığında IL-10 seviyeleri düşük olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi($p=0,53$ ve $p=0,32$). 5-FU 25 µg/ml grubu tüm kolesteatom hücre kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-10 düzeylerini düşürdü($p<0,01$). HEKa hücrelerinde 5-FU 15 ve 25 µg/ml doz gruplarında HEKa 48. saat kontrol grubuna göre IL-10 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük izlenmiştir($p<0,01$). 5-FU 10 µg/ml HEKa doz grubunda ise HEKa 48. saat

kontrol grubuna göre IL-10 düzeyleri azalmış; fakat istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır(p=0,18). Siklosporin grubu incelendiğinde; 0,3 µg/ml doz grubu ile kolesteatom hücre kontrol grubu karşılaştırıldığında IL-10 seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı(p=0,73). 48. saat kolesteatom hücre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-10 seviyeleri düşük saptandı(p<0,01). 2 µg/ml doz grubu ile tüm kolesteatom hücre kontrol grupları karşılaştırıldığında IL-10 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük saptanmıştır(p<0,01). 10 µg/ml doz grubu ile tüm kolesteatom hücre grupları karşılaştırıldığında IL-10 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük saptanmıştır(p<0,01). Siklosporinin HEKa hücrelerine etkileri incelendiğinde tüm doz gruplarında HEKa 48. saat kontrol grubuna göre IL-10 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük izlenmiştir(p<0,01). Takrolimus ilaç grupları incelendiğinde; 10^{-10} M doz grubu ile kolesteatom hücre kontrol grubu ve kolesteatom 48. saat hücre kontrol grubu, IL-10 seviyeleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düşüklük saptandı(p=0,04 ve p=0,01). 10^{-8} M ve 10^{-6} M doz grupları tüm kolesteatom hücre grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-10 seviyelerini düşürdü(p<0,01). Takrolimus uygulanan HEKa hücrelerinde 10^{-6} M ve 10^{-8} M doz grubunda HEKa 48. saat kontrol grubuna göre IL-10 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük saptandı(p<0,01). 10^{-10} M Takrolimus HEKa grubunda ise HEKa 48. saat kontrol grubuna göre IL-10 seviyeleri yüksek saptandı; fakat bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi(p=0,12).

4.8.5. Ki67 Sitokin Düzeyleri

Ki67 için her grubun ortalama sitokin düzeyleri, standart sapmaları Tablo 4.11.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.11. Ki67 Sitokin Düzeyleri Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Gruplar	Mean	SD	N
İmiquimod 10 µg/ml	15,62	2,16	3
İmiquimod 20 µg/ml	12,47	2,02	3
İmiquimod 50 µg/ml	10,46	3,01	3
İmiquimod 5 µg/ml	9,20	1,70	3

Tablo 4.11.'Devam' Ki67 Sitokin Düzeyleri Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

5-florourasil 10 µg/ml	1,32	1,12	3
5-florourasil 15 µg/ml	6,67	1,04	3
5-florourasil 25 µg/ml	4,17	1,25	3
HEKa İmiquimod 10 µg/ml	6,49	0,86	3
HEKa İmiquimod 20 µg/ml	6,09	1,21	3
HEKa İmiquimod 50 µg/ml	9,90	1,07	3
HEKa İmiquimod 5 µg/ml	8,75	1,51	3
HEKa 5-florourasil 10 µg/ml	5,25	0,09	3
HEKa 5-florourasil 15 µg/ml	3,73	0,88	3
HEKa 5-florourasil 25 µg/ml	8,43	0,66	3
HEKa Kontrol 48.saat	18,94	2,00	3
HEKa Siklosporin 0,3 µg/ml	9,06	0,68	3
HEKa Siklosporin 10 µg/ml	9,15	0,87	3
HEKa Siklosporin 2 µg/ml	4,71	1,14	3
HEKa Takrolimus 10^{-10} M	7,63	1,56	3
HEKa Takrolimus 10^{-6} M	0,41	0,41	3
HEKa Takrolimus 10^{-8} M	9,20	1,10	3
Kolesteatom Kontrol	15,40	1,47	3
Kolesteatom Kontrol 48.saat	23,51	0,72	3
Siklosporin 0,3 µg/ml	1,60	1,42	3
Siklosporin 10 µg/ml	4,08	1,80	3
Siklosporin 2 µg/ml	12,06	3,11	3
Takrolimus 10^{-10} M	3,17	1,22	3
Takrolimus 10^{-6} M	6,41	1,50	3
Takrolimus 10^{-8} M	6,88	1,46	3

Mean:Ortalama Sitokin Değeri, SD:Standart Sapma, N:Grup Sayısı

Ki67 sitokin düzeyleri ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.11. 'de verilmiştir. Kolesteatom hücreleri kontrol grubunda ortalama Ki67 düzeyi 15,4 ng/ml; kolesteatom 48.saat kontrol grubunda ise 23,51 ng/ml olarak saptanmıştır. Bu fark istatistiksel olarak da anlamlıdır($p<0,01$). HEKa 48. saat kontrol grubunda ortalama Ki67 seviyesi 18,94 olarak saptandı. Kolesteatom hücre kontrol grubu ve kolesteatom 48. saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak Ki67 düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı($p=0,43$ ve $p=0,08$). İmiquimod ilaç grubu incelendiğinde 5 µg/ml doz grubu ile tüm kolesteatom hücre kontrol grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde Ki67 seviyeleri düşük olarak saptandı($p<0,01$). 10 µg/ml doz grubu Ki67 düzeyleri açısından kolesteatom hücre

kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı(p=1). Kolesteatom 48. saat kontrol grubuna göre ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde Ki67 seviyeleri düşük olarak saptandı(p<0,01). 20 µg/ml doz grubu; kolesteatom hücre kontrol grupları ile Ki67 seviyeleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı(p=0,82). Kolesteatom 48. saat kontrol grubuna göre ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde Ki67 seviyeleri düşük olarak saptandı(p<0,01). 50 µg/ml grubu kolesteatom hücre kontrol grubu ve kolesteatom 48. saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde Ki67 seviyeleri düşük olarak ölçüldü(p=0,04 ve p<0,01). İmiquimod tüm doz gruplarında Ki67 seviyelerini düşürmesine rağmen bu durum 5 µg/ml ve 50 µg/ml dozunda tüm kolesteatom hücre kontrol grupları ile yapılan karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İmiquimod uygulanan HEKa hücrelerinde tüm doz gruplarında HEKa 48. saat kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak Ki67 seviyeleri düşük olarak izlendi(p<0,01). 5-FU grubu incelendiğinde; tüm doz grupları kolesteatom hücre kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde Ki67 seviyeleri düşük olarak bulundu(p<0,01). 5-FU tüm doz gruplarında Ki67 seviyelerini azaltmıştır. 5-FU aynı şekilde HEKa hücrelerinde tüm doz gruplarında HEKa 48. saat kontrol grubuna göre Ki67 düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürmüştür(p<0,01). Siklosporin grubu incelendiğinde; 0,3 µg/ml ve 10 µg/ml doz grupları tüm kolesteatom hücre grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde Ki67 düzeyleri düşük olarak saptandı(p<0,01). 2 µg/ml doz grubu ile kolesteatom hücre kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı(p=0,59). Kolesteatom 48. saat kontrol grubu ile karşılaştırldığında ise Ki67 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olarak saptandı(p<0,01). Siklosporin uygulanan HEKa hücrelerinde tüm doz gruplarında HEKa 48. saat kontrol grubuna göre Ki67 düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük ölçüldü(p<0,01). Takrolimus tüm ilaç doz gruplarında, tüm kolesteatom hücre kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde Ki67 seviyelerini düşürmüştür(p<0,01). Aynı şekilde Takrolimus uygulanan HEKa hücrelerinde tüm doz gruplarında HEKa 48. saat kontrol grubuna göre Ki67 düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürmüştür(p<0,01).

4.8.6. TNF- α Sitokin Düzeyleri

TNF-α için ortalama sitokin düzeyleri, standart sapmaları Tablo 4.12'de gösterilmiştir.

Tablo 4.12. TNF-α Sitokin Düzeyleri Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Gruplar	Mean	SD	N
İmiquimod 10 µg/ml	133,80	5,43	3
İmiquimod 20 µg/ml	149,73	9,68	3
İmiquimod 50 µg/ml	122,13	2,90	3
İmiquimod 5 µg/ml	160,90	12,33	3
5-florourasil 10 µg/ml	148,00	11,52	3
5-florourasil 15 µg/ml	73,03	9,15	3
5-florourasil 25 µg/ml	113,73	13,51	3
HEKa İmiquimod 10 µg/ml	67,33	16,49	3
HEKa İmiquimod 20 µg/ml	117,23	6,70	3
HEKa İmiquimod 50 µg/ml	169,23	11,23	3
HEKa İmiquimod 5 µg/ml	162,33	19,55	3
HEKa 5-florourasil 10 µg/ml	90,00	11,38	3
HEKa 5-florourasil 15 µg/ml	129,87	15,18	3
HEKa 5-florourasil 25 µg/ml	139,17	17,71	3
HEKa Kontrol 48.saat	39,83	1,89	3
HEKa Siklosporin 0,3 µg/ml	133,47	18,73	3
HEKa Siklosporin 10 µg/ml	137,67	14,81	3
HEKa Siklosporin 2 µg/ml	132,37	14,69	3
HEKa Takrolimus 10^{-10} M	135,90	24,27	3
HEKa Takrolimus 10^{-6} M	125,13	8,81	3
HEKa Takrolimus 10^{-8} M	156,13	19,53	3
Kolesteatom Kontrol	251,33	9,90	3
Kolesteatom Kontrol 48.saat	217,13	12,19	3
Siklosporin 0,3 µg/ml	184,23	5,35	3
Siklosporin 10 µg/ml	184,03	15,48	3
Siklosporin 2 µg/ml	186,77	26,60	3
Takrolimus 10^{-10} M	152,13	20,72	3
Takrolimus 10^{-6} M	152,30	14,70	3
Takrolimus 10^{-8} M	154,47	18,32	3

Mean:Ortalama Sitokin Değeri, SD:Standart Sapma, N:Grup Sayısı

TNF-α sitokin düzeyleri ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.12.'de verilmiştir. Kolesteatom hücreleri kontrol grubunda ortalama TNF-α düzeyi 251,33 ng/L; 48.saat kontrol grubunda ise 217,13 ng/L olarak saptanmıştır. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir(p=0,5). HEKa 48. saat kontrol grubunda ise TNF-

α ortalama düzeyi 39,83 ng/L olarak saptanmıştır, bu değer tüm kolesteatom hücre kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur($p<0,01$). İmiquimod grubu incelendiğinde tüm doz grupları kolesteatom hücre kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde TNF-α düzeyleri düşük olarak saptanmıştır($p<0,01$). İmiquimod uygulanan HEKa hücreleri 5, 20 ve 50 µg/ml doz gruplarında; HEKa hücre 48. saat kontrol grubuna göre TNF-α düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır($p<0,01$). 10 µg/ml doz grubunda ise bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır($p=0,86$). 5-FU grubu incelendiğinde tüm doz grupları kolesteatom hücre kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde TNF-α düzeyleri düşük olarak saptanmıştır($p<0,01$). 5-FU uygulanan tüm HEKa hücre doz gruplarında ise HEKa 48. saat kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde TNF-α düzeyleri artmıştır(0,3 ve 2 µg/ml grubunda $p<0,01$- 10 µg/ml grubunda $p=0,02$). Siklosporin tüm doz gruplarında, kolesteatom hücre kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde TNF-α düzeylerini düşürmüştür($p<0,01$). 0,3 µg/ml, 2 µg/ml, 10 µg/ml doz grubu sırasıyla 48. saat kolesteatom hücre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise TNF-α düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır($p=0,58$; $p=0,73$; $p=0,56$). Siklosporin uygulanan tüm HEKa hücre doz gruplarında ise HEKa 48.saat kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde TNF-α düzeyleri artmıştır($p<0,01$). Takrolimus tüm doz gruplarında kolesteatom hücre kontrol grupları ile karşılaştırıldığında TNF-α düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olarak saptanmıştır($p<0,01$). Takrolimus uygulanan tüm HEKa hücre doz gruplarında ise HEKa 48.saat kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde TNF-α düzeyleri artmıştır($p<0,01$).Tüm ilaç grupları içerisinde en düşük TNF-α düzeyi 5-FU 15 µg/ml doz grubunda 73,03 ng/L olarak saptanmıştır.

4.9. Grupların Canlılık Ölçümleri

Grupların canlılık yüzdelerine ait standart sapma ve ortalama değerler Tablo 4.13.'de verilmiştir.

Tablo 4.13. Hücre Canlılık Yüzdeleri Standart Sapma ve Ortalama Değerleri

Gruplar	Mean	SD	N
İmiquimod 10 µg/ml	61,03	0,89	3
İmiquimod 20 µg/ml	53,85	7,45	3
İmiquimod 50 µg/ml	33,86	1,03	3
İmiquimod 5 µg/ml	64,03	1,41	3
5-florourasil 10 µg/ml	54,94	2,12	3
5-florourasil 15 µg/ml	54,04	3,55	3
5-florourasil 25 µg/ml	45,25	4,29	3
HEKa İmiquimod 10 µg/ml	40,75		1
HEKa İmiquimod 20 µg/ml	25,00		1
HEKa İmiquimod 50 µg/ml	12,75		1
HEKa İmiquimod 5 µg/ml	44,15		1
HEKa 5-florourasil 10 µg/ml	75,00		1
HEKa 5-florourasil 15 µg/ml	62,50		1
HEKa 5-florourasil 25 µg/ml	53,00		1
HEKa Siklosporin 0,3 µg/ml	67,15	4,21	3
HEKa Siklosporin 10 µg/ml	14,30		1
HEKa Siklosporin 2 µg/ml	40,50		1
HEKa Takrolimus 10^{-10} M	83,25		1
HEKa Takrolimus 10^{-6} M	14,00		1
HEKa Takrolimus 10^{-8} M	50,00		1
HEKa Kontrol	82,25		1
HEKa Kontrol 48.saat	82,25		1
Kolesteatom Kontrol	82,30	10,72	3
Kolesteatom Kontrol 48.saat	86,67	3,34	3
Siklosporin 0,3 µg/ml	59,79	6,01	3
Siklosporin 10 µg/ml	49,74	1,84	3
Siklosporin 2 µg/ml	50,56	7,88	3
Takrolimus 10^{-10} M	69,45	4,81	3
Takrolimus 10^{-6} M	49,47	1,42	3
Takrolimus 10^{-8} M	64,96	2,96	3

Mean:Ortalama Canlılık Yüzdesi, SD:Standart Sapma, N:Grup Sayısı

Hücre canlılık yüzdeleri için ortalama değerler ve standart sapmalar Tablo 4.9.'da verilmiştir. Kolesteatom hücreleri kontrol grubunda ortalama canlılık yüzdesi 82,3; 48. saat kolesteatom hücre kontrol grubunda ise 86,67 olarak saptanmıştır. Bu iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark yoktur(p=1,00). HEKa kontrol grubu ve HEKa 48. saat kontrol grubu canlılık yüzdesi 82,25 olarak saptanmıştır. Bu grupların kolesteatom hücre kontrol grupları ile yapılan karşılaştırmasında

istatsitiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır(p=1,00). İmiquimod tüm doz gruplarında kolesteatom hücre kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde canlılık yüzdelerini azaltmıştır, sitotoksik etki göstermiştir(p<0,01). Bu etki 50 µg/ml doz grubunda ortalama canlılık yüzdesi 33,86 ile en belirgindir, bu değer ilaç uygulanan kolesteatom hücre grupları arasındaki en düşük canlılık değeridir. İmiquimodun HEKa hücrelerine olan etkisi incelendiğinde; tüm doz gruplarında HEKa hücre kontrol gruplarına göre canlılık düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olarak saptanmıştır(p<0,01). 5-FU tüm doz gruplarında kolesteatom hücre kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde canlılık yüzdeleri düşük olarak bulunmuştur(p<0,01). HEKa hücre kontrol grupları ile 5-FU 10 ve 15 µg/ml doz grubu sırasıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır(p=1,00 ve p=0,50). 5-FU 25 µg/ml doz grubu HEKa hücre kontrol grupları ile karşılaştırldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde canlılık yüzdeleri düşük saptanmıştır(p=0,03). Siklosporin tüm doz gruplarında da kolesteatom hücre kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde canlılık yüzdeleri düşük olarak bulunmuştur(p<0,01). Siklosporin uygulanan HEKa hücreleri 2 ve 10 µg/ml doz gruplarında HEKa hücre kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde canlılık yüzdeleri düşük olarak saptanmıştır(p<0,01). 0,3 µg/ml doz grubu ise HEKa hücre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı(0,62). Takrolimus grupları incelendiğinde 10^{-10} M doz grubunda kolesteatom hücre kontrol grubuna göre istatstiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır(p=0,29). 48. saat kolesteatom kontrol grubuna göre canlılık yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olarak saptanmıştır(p=0,03). 10^{-8} M doz grubunda, hem kolesteatom hücre kontrol grubu, hem de 48. Saat kolesteatom hücre kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde canlılık yüzdeleri düşük olarak saptanmıştır(p=0,02 ve p<0,01). 10^{-6} M doz grubunda tüm kolesteatom hücre kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde canlılık yüzdeleri düşük olarak bulunmuştur(p<0,01). Takrolimus uygulanan HEKa hücreleri 10^{-6} M ve 10^{-8} M doz grupları tüm HEKa hücre kontrol grupları ile karşılaştırldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde canlılık yüzdeleri düşük olarak saptanmıştır(p<0,01). 10^{-10} M doz grubunda ise HEKa hücre kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır(p=1,00).

5.TARTIŞMA

EAONO/JOS tarafından 2017 yılında yapılan son tanımlamaya göre kolesteatom; timpanik veya mastoid kavite içerisinde keratinize skuamoz epitel ve supepitelyal bağ doku fragmanlarından oluşan, sürekli keratin debris üreten kitle olarak tanımlanmıştır. Konjenital, akkiz ve klasifiye edilemeyen tip olarak 3 başlıkta incelenen kolesteatomun, en sık akkiz formu görülmektedir, konjenital form ise nadirdir(1, 11). Kolesteatom dokusu kemik rezorbsiyonu yapması sebebiyle destruktif ilerleyerek işitme kaybı, vestibüler disfonksiyon, fasiyal paralizi, menenjit, beyin absesi gibi önemli komplikasyonlara sebep olmaktadır(3). Gelişen teknolojilere, yapılan araştırmalara rağmen hastalığın kesin etyopatogenezi halen ortaya konulamamıştır(13). Bu nedenle günümüzde kolesteatom tedavisinde küratif olarak uygulanan ve kabul gören tek tedavi seçeneği cerrahidir(4). Cerrahi maliyeti, nüks oranları, morbiditesi özellikle akkiz kolesteatoma yönelik alternatif medikal tedavi araştırmalarına hız kazandırmıştır(7). Çözüm bekleyen tüm bu sorulardan hareketle bu çalışmada; akkiz kolesteatom etyopatogenezinde sorumlu olduğu düşünülen moleküler yolaklar ve sitokinlerle ilgili veri toplamak, potansiyel tedavi molekülleri uygulayarak etyopatogenezden sorumlu olası yolakları bloke edip kolesteatom hücrelerinin proliferasyonunu durdurmak, alternatif medikal tedavi araştırmaları için yeni potansiyel moleküller belirlemek amaçlanmıştır.

Günümüzde akkiz kolesteatom gelişiminde kronik otitis mediadaki inflamatuar süreçlerin başlattığı, immun yanıtla indüklenen, kompleks hücresel moleküler mekanizmaların görev aldığı kabul edilmektedir(8, 12). Çalışmaların yoğunlaştığı bu kompleks yolaklar *Epidermal Growth Factor Receptor(EGFR)/Phosphoinositide 3-Kinase(PI3K)/Protein Kinase B(PKB)* sinyal yolağı, *Mitogen-Activated Protein Kinase(MAPK)* sinyal yolağı, *IL-6/Signal Transducer and Activator of Transcription* 3(STAT) sinyal yolağı, *Inhibitor of DNA Binding/Differentiation-1(Id-1)/NF-κB/CyclinD1* sinyal yolağı, *MicroRNA(miRNA)* aracılı sinyal yolağı, *Keratinocyte Growth Factor(KGF)/KGF Receptor(KGFR)* sinyal yolağı olarak özetlenebilir. Kolesteatom etyopatogenezinde etkili olduğu düşünülen tüm bu kompleks yolaklar sonucunda kolesteatom matriksinden IL-1, IL-6, TNF-α gibi inflamatuar mediatörler salınmaktadır ve bu kontrolsüz inflamatuar süreç sonucunda mevcut komplikasyonlar oluşmaktadır(12, 13). Çalışmamızda

yapılan akkiz kolesteatom hücre kültürü modellemesinde; hiçbir ilacın uygulanmadığı kolesteatom 48. saat kontrol grubu ve HEKa 48. saat kontrol grubu ortalama sitokin düzeyleri açısından karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda kolesteatom hücrelerinde sağlıklı keratinositlere(HEKa) göre IL-6, IL-10, TNF-α inflamatuar sitokin seviyeleri yüksek olarak saptanmıştır ve bu durum istatistiksel olarak anlamlıdır. Ki67 düzeyleri de kolesteatom 48. saat kontrol grubunda yüksek olarak saptanmıştır; fakat HEKa 48.saat kontrol grubuna göre bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildir. IL-8 düzeyleri ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde HEKa 48. saat kontrol grubunda kolesteatom 48. saat kontrol grubuna göre yüksek saptanmıştır. IL-1 seviyeleri bu iki grup arasında benzer düzeydedir ve istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

Literatürde kolesteatomda sitokin düzeyleri ile ilgili birçok çalışma mevcuttur: Kuczkowski ve ark.(109) 2010 yılında kolesteatom hücreleri, normal cilt ve kronik otitte izlenen granulasyon dokusunu sitokin profili açısından karşılaştırdığı çalışmasında kolesteatom dokusunda IL-1, IL-6, TNF-α seviyeleri yüksek saptanmış; IL-10 seviyesi ise granulasyon dokusunda yüksek diğer gruplarda normal bulunmuştur. Ayrıca dokuların alındığı hastalar incelendiğinde IL-1, IL-6, TNF-α seviyeleri ile kemik rezorbsiyonu arasında pozitif korelasyon, IL-10 ile negatif korelasyon ilişkisi saptanmıştır. Bu sebeple IL-10'un kolesteatom etyopatogenezinde inflamasyonu yavaşlatıcı dengeleyici bir sitokin olabileceği, diğer sitokinlerin kolesteatom etyopatogenezinde önemli rol oynadığı hipotezi ortaya atılmıştır.

Hilton ve ark.(110) yaptığı kolesteatom hücre kültürü çalışmasında; kolesteatom hücreleri ve normal deri keratinositlerinin kronik inflamasyona sekonder cevapları karşılaştırılmıştır. TNF-α uygulanan kolesteatom hücreleri, aynı prosesin uygulandığı normal deri keratinositlerine göre çok yüksek miktarda IL-8 sitokini üretmiştir. Bu cevap kolesteatom tedavisinde inflamasyonu kontrol altına almanın çok önemli olduğunu, hastalık progresyonunda kronik inflamasyonun ve bozulmuş hücre cevabının ön planda olduğunu göstermektedir.

2014 yılında Britze ve ark.(111) kolesteatom sitokin profili üzerine yaptığı çalışmada kolesteatom dokusunda IL-8 seviyelerini yüksek, IL-6 seviyelerini ise düşük bulmuşlardır. Literatürden farklı olarak saptanan IL-6 seviyesindeki

düşüklüğün sebebinin kolesteatom nedeniyle hastaların yoğun antibiyotik alması veya immun yanıtın her hastada aynı olamayabileceği sonucuyla açıklamaya çalışmışlardır.

Liu ve ark.(79) yaptığı çalışmada ise kolesteatom hücrelerinde yüksek IL-6 ve STAT3 seviyeleri saptanmış; etyopatogenezde IL-6/JAK/STAT sinyal yolağının önemli rol oynadığı gösterilmiştir.

Surarto ve ark.(112) yaptığı güncel çalışmada kolesteatom dokusunda IL-1 ve TNF-α seviyeleri yüksek olarak saptanmıştır. Çalışmada bu dokuların alındığı hastalarda şiddetli kemik destruksiyonunun görülmesi yüksek IL-1 ve TNF-α seviyelerinin şiddetli kemik destruksiyonunun bir belirteci olduğu gösterilmiştir.

Kolesteatom sitokin seviyeleri üzerine Imai ve ark.(113) yaptığı çalışmada kolesteatom hücrelerinde IL-1, IL-6, TNF-α ve prostoglandin E2(PGE2) seviyeleri yüksek olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada; kolesteatom dokusunda ve kolesteatom dokusuna uzak kemik alanlarından alınan hücrelerde saptanan yüksek RANKL ekspresyonunun ve bu inflamatuar sitokinlerin osteoklastogenezi uyararak komplikasyonlara sebep olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle bu sitokinleri inhibe edecek tedavi ajanlarının hem kolesteatom proliferasyonunu hem de kemik rezorbsiyonunu engelleyebileceği belirtilmiştir.

Çalışmamızda da literatür(79,109,112,113) ile uyumlu olarak saptanan proinflamatuar sitokin yüksekliği kolesteatom hücrelerindeki kontrolsüz inflamatuar süreci kanıtlamaktadır. Bahsedilen literatürlerle uyumlu olarak çalışmamızda; IL-6 ve TNF-α seviyeleri kolesteatom hücrelerinde yüksek olarak saptandı, kemik rezorbsiyonu gibi komplikasyonlarda da önemli rol oynayan bu sitokinlerin kolesteatom patogenezinde hedef sitokinler olması gerektiğini, patogenezde ana rol oynadıklarını düşünmekteyiz. Literatürde de Surarto ve ark.(112), Imai ve ark.(113) bu sitokin yüksekliği ile kemik rezorbsiyonu arasındaki ilişkiyi ortaya koyarak kolesteatomun yarattığı komplikasyonların arkasında bu kontrolsüz inflamasyonun olduğunu göstermişlerdir. Kuczkowski ve ark.(114) özellikle TNF-α, IL-1 ve IL-6 seviyeleri ile kemik rezorbsiyonu arasında yüksek ilişki olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmamızda da yüksekliği saptanan IL-6 ve TNF-α'nın etki mekanizmaları düşünüldüğünde JAK/STAT, MAPK ve PI3K/Akt(PKB) sinyal yolaklarının ana

inceleme konusu olması gerektiğini ve bu yolaklar sonucunda ortak olarak oluşan NF-κB'nın tedavide hedef molekül olması gerektiğini mevcut bilgiler ışığında varsaymaktayız. IL-10 düzeylerinde saptanan yüksekliğin kontrolsüz inflamasyonu dengelemek amacıyla bir yanıt olarak geliştiği, bunun komplikasyonlara karşı Kuczkowski ve ark.(109) da belirttiği gibi koruyucu olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda; bahsedilen çalışmaların aksine IL-1 seviyelerinde sağlıklı hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı; bu durumun Britze ve ark.(111) belirttiği gibi hücresel immun yer alabilecek bir varyasyon olduğunu düşünmekteyiz. Sağlıklı hücrelerde saptanan IL-8 yüksekliği ise kolesteatom etyopatogenezinde IL-8'in ön planda yer almadığını düşündürmektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında; kolesteatom üzerine geliştirilecek olan alternatif medikal tedavi; bu inflamatuar sitokinleri baskılayarak ve antiinflamatuar etki göstererek hem proliferasyonu, hem de kemik rezorbsiyonunu dolayısıyla komplikasyonları engelleyen bir molekül olmalıdır. Ek olarak bu molekülün orta kulağa kolay uygulanabilmesi, efektif topikal formunun olması, minimal ototoksik ve yan etki potansiyeli taşıması en az tedavi etkinliği kadar önemlidir.

Kolesteatom etyopatogenezinde, hastalığın destruktif seyrinde bir diğer önemli mekanizma kontrolsüz proliferasyon ve bozulmuş apopitoz dengesidir(47). Yapılan çalışmalarda kolesteatom hücrelerinde proliferasyonun arttığı ve hücre ölümünden sorumlu apopitoz mekanizmalarının bozulduğu gösterilmiştir(47). Ki67 hücre proliferasyonunu gösteren, uzun yıllardır kanser araştırmalarında da kullanılan önemli bir hücre proliferasyon belirtecidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Ki67'nin sadece bir proliferasyon markerı olmadığı, hücre mitozunda indükleyici ve düzenleyici rolünün olduğu da gösterilmiştir(115, 116). Bu nedenle Ki67'nin sadece hücresel proliferasyonu değil hastalıkların progresyonunu, destruktif kapasitesini yansıttığı gelecek araştırmalarda potansiyel bir tedavi hedef molekülü olabileceği savunulmaktadır(117). Mevcut çalışmamızda kolesteatom 48. saat kontrol grubu ve HEKa 48. saat kontrol grubu Ki67 seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve kolesteatom hücrelerinde Ki67 seviyeleri yüksek olarak saptanmıştır. Fakat yapılan istatistiksel incelemede bu bulgu ne yazıkki anlamlı olarak saptanmamıştır. Ki67 yüksekliği kolesteatom hücrelerindeki yüksek proliferasyon kapasitesini

yansıtmaktadır. Literatürde kolesteatom hücrelerinde Ki67 seviyeleri ile ilgili birçok çalışma mevcuttur:

Mallet ve ark.(118) Ki67 nükleer antijenini, MIB-1 monoklonal antikoru ile değerlendirdiği çalışmada; Ki67 seviyeleri kolesteatom dokusunda yüksek olarak saptanmış ve bu hastalar detaylı incelendiğinde hastalığın progresyonu ve destruktif kapasitesinin Ki67 ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Erişkin kolesteatomlarına göre daha agresif seyreden çocukluk çağı kolesteatomlarında Ki67 nükleer antijen seviyelerinin daha yüksek olduğunu da belirtmişlerdir. Kısacası Ki67 sadece bir proliferasyon markerı değil aynı zamanda bir hastalık progresyon belirtecidir.

Sikka ve ark.(119) ise pediatrik ve erişkin kolesteatom dokusunda Ki67 seviyeleri üzerine yaptığı çalışmada normal cilt epiteline göre her iki grupta Ki67 seviyeleri yine yüksek saptanmış ve bu durum kolesteatomun yüksek proliferatif kapasitesi ile ilişkilendirilmiştir. Fakat erişkin ve pediatrik grupta kolesteatom dokusunda Ki67 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır. Ki67 seviyeleri ile erişkin ve pediatrik grupta hastalığın seyri ilişkisi Mallet ve ark.(118) aksine kurulamamıştır.

Aslıer ve ark.(120) yaptığı kolesteatom dokusunda Ki67 seviyeleri üzerine olan çalışmada; Ki67 seviyeleri kolesteatom dokusunda yüksek olarak saptanmış ve kemik rezorbsiyonu ile bu seviye arasında güçlü bir ilişki ortaya konmuştur. Literatür bulgularının aksine olarak erişkin grupta pediatrik gruba göre Ki67 seviyeleri ve kemik rezorbsiyonu daha fazla görülmüş; bu nedenle hastalığın erişkin grupta daha agresif seyrettiği hipotezi öne sürülmüştür.

Server ve ark.(121) da kolesteatomda Ki67 seviyelerini inceledikleri çalışmalarında malleus destruksiyonu olan grupta diğer kolesteatom gruplarına göre anlamlı derecede yüksek Ki67 seviyeleri saptamıştır. Ki67 seviyesinin hastalığın destruktif kapasitesini de gösterdiğini belirtmişlerdir.

Hamed ve ark.(122) kolesteatomun destruktif kapasitesine yönelik yaptıkları araştırmada da kemik rezobsiyon skoru yüksek olan vakalarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde Ki67 seviyeleri yüksek olarak bulunmuştur. Ki67'nin kolesteatomun destruktif paternini gösteren güvenilir bir belirteç olduğu vurgulanmıştır.

Tüm bu verilerin ışığında ister erişkin, ister pediatrik grupta olsun Ki67 seviyesinin kolesteatom hücrelerinin proliferasyonunu ve kemik rezorbsiyonu gibi komplikasyonlara yol açan destruktif kapasitesini gösteren önemli bir marker olduğu görülmektedir. Hücre moleküler biyolojisine yönelik yapılan çalışmalarla da desteklenen bu durum hücre mitozunda önemli indükleyici görevleri olan Ki67'nin gelecekte sadece bir biyolojik marker değil potansiyel bir tedavi molekülü olduğu hipotezini desteklemektedir.

Kolesteatom patogenezinde sadece proliferasyon süreçleri değil bozulmuş apopitoz-antiapopitoz dengesi de çok önemlidir. Bu durum Chung ve ark.(61) kolesteatom hücrelerinde yaptıkları apopitoz-antiapopitoz araştırmasında incelenmiştir. Kolesteatom hücrelerinde normal cilt hücrelerine göre yüksek Ki67, c-FLIP seviyeleri saptanmış, p53 seviyeleri ise normal bulunmuştur. Antiapopitotik bir protein olan c-FLIP seviyelerinin yükselmesine rağmen apopitoz proteini p53 seviyelerinin normal olması antiapopitoz lehine bozulan dengeyi kanıtlamaktadır.

Friedland ve ark.(62) da kolesteatom dokusunda yaptıkları çalışmada hücre proliferasyonunu artırıcı ve apopitozu inhibe edici etkisi olan miRNA-21 seviyelerini yüksek olarak saptamışlardır. Bu çalışmada kolesteatomdaki bozulmuş apopitoz sürecini göstermektedir. Bu bilgiden hareketle Zhang ve ark.(63) miRNA-let 7a'nın miRNA21 seviyelerini baskılayarak kolesteatom proliferasyonunu durdurduğunu ve apopitozu indükleyerek potansiyel bir tedavi sinyal yolağı olabileceğini göstermişlerdir.

Kolesteatomdaki ideal medikal tedavi hücre proliferasyonunu durdurmalı, sitotoksik etki göstererek apopitoz dengesini yeniden oluşturmalıdır. Kolesteatom etyopatogenezindeki proliferasyon ve apopitoz yolaklarına yönelik araştırmalar bu nedenle çok kıymetlidir. Kolesteatoma yönelik medikal tedavi araştırmaları uzun yıllardır devam etmektedir. Bu konuda cilt tümörleri tedavisinde de uzun yıllardır kullanılan 5-FU'nun kolesteatom hücrelerine etkisi ile ilgili literatürde birçok çalışma mevcuttur(15, 95-97).

Takahashi ve ark.(16) %5'lik 5-FU topikal kremin kolesteatom hastaları üzerindeki etkilerini araştırdıkları klinik çalışmalarında %59 hastada kolesteatom debrisi tamamen kaybolmuş, 1 aydan uzun süre oluşmamıştır, %29 hastada

kolesteatom debrisi gerilemiş, %12 hastada ise kolesteatom debrisinde azalma olmamıştır. Önemli bir yan etki gözlenmemiştir, ototoksik etkiden endişe ettiklerini vurgulayan yazarlar %5'lik 5-FU topikal kremi mikroskop altında sadece kolesteatom yüzeyine uyguladıklarını, iç kulak yapılarına kaçmaması için özen gösterdiklerini vurgulamışlardır. Bu sebeple dış kulak yolu kolesteatomlarında, mastoid aerasyonu iyi attik bölge yerleşimli kolesteatomlarda, rekurren vakalarda 5-FU'nun kullanılabileceğini belirtmişlerdir. İleri evre vakalarda, mastoid aerasyonu kötü attik bölge kolesteatomlarında, adeziv kulaklarda bu ilacın etkisinin sınırlı olduğunun altını çizmişlerdir.

Yamamato-Fukuda ve ark.(15) 5-FU'nun kolesteatom hücreleri üzerindeki etkilerini gözledikleri çalışmalarında; 5-FU uygulanan ve uygulanmayan hastalardan alınan kolesteatom dokusu örneklerinde yapılan incelemede 5-FU uygulanan hastalardan alınan örneklerde düşük KGF ve Ki67 düzeyleri saptanmıştır. 5-FU'nun kolesteatom hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, apopitozu indüklediği belirtilmiştir. Ototoksik etkiler de göz önünde bulundurularak 5-FU'nın kulak zarı perforasyonu olmayan dış kulak yolu veya attik bölge erken evre kolesteatomlarında kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

Iwanaga ve ark.(17) 5-FU'nın yan etkilerine yönelik yaptıkları hayvan deneyi çalışmasında 5-FU'nun ototoksik olduğu saptanmıştır. Bu nedenle 5-FU'in dış kulak yolu kolesteatomlarında kullanılması gerektiği, kulak zarı perforasyonu, semisirkuler kanal fistülü gibi durumlarda bu tedavinin tercih edilmemesi gerektiğinin altı çizilmiştir.

Samer Badee Kamel'in çalışmasında(97) timpanomastoidektomi sonrası kaviteye topikal 5-FU uygulamasının sonuçları araştırılmıştır. 6 aylık izlem sonuçlarında granulasyon dokusu ve debris miktarı tamamen kaybolan veya gerileyen hasta oranı %85 olarak saptanmıştır. Bununla birlikte hastalarda işitme kaybı, tinnitus gibi yan etkiler rapor edilmemiştir. Post-mastoidektomi hastalarında 5-FU kullanımı önerilmiştir.

Mevcut çalışmamızda; 5-FU uyguladığımız kolesteatom hücreleri tüm doz gruplarında, kolesteatom 48. saat kontrol grubuna kıyasla IL-1, TNF-α, Ki67 ve canlılık düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüklük saptandı. Tüm 5-FU doz

gruplarında kolesteatom 48. saat kontrol grubuna göre IL-6 seviyeleri ise yüksek izlendi. IL-8 seviyeleri incelendiğinde; 5-FU 10 ve 15 µg/ml doz grupları kolesteatom 48. saat kontrol grubuna göre IL-8 seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmış, 25 µg/ml doz grubunda ise azaltmıştır. IL-10 düzeylerinde 5-FU 10 ve 25 µg/ml doz gruplarında, kolesteatom 48. saat kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüklük saptandı. 15 µg/ml doz grubunda da IL-10 seviyeleri düşük izlendi; fakat bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi. IL-8 ve IL-6 dışında tüm sitokin seviyeleri ve canlılık yüzdeleri 5-FU tüm doz gruplarında kolesteatom 48. saat kontrol grubuna göre düşük izlendi. 5-FU kolesteatom hücrelerindeki hem kontrolsüz inflamasyonu hem de kontrolsüz proliferasyonu durdurdu. Tripan Blue ile yapılan canlılık ölçümlerinde kolesteatom 48.saat kontrol grubunda canlılık %86 iken; 5-FU 25 µg/ml dozunda %45,25 olarak saptandı, 5-FU kolesteatom hücreleri üzerinde sitotoksik etki de göstermiştir.

5-FU çalışmamızda da görüldüğü üzere kolesteatom hücrelerinin proliferasyonunu yavaşlatmakta, antiinflamatuar etkisiyle hastalık kontrolünde fayda sağlamaktadır. Çalışmamızda 5-FU uygulanan hücrelerde tüm doz gruplarında IL-6'nın artması kolesteatom komplikasyonlarını engellemede 5-FU'nun yetersiz olabileceğini düşündürmüştür; Çünkü IL-6 kemik rezorbsiyon mekanizmalarında çok önemli bir sitokindir. Ayrıca mevcut ototoksik etkileri, DNA-RNA sentezini patolojik veya normal tüm hücrelerde bloklaması daha spesifik, daha az yan etki içeren tedavi seçeneklerinin araştırılmasını zorunlu kılmıştır. Bu nedenle çalışmamızda; kolesteatom hücrelerine etkisi bahsedilen literatür çalışmalarıyla ortaya konulan 5-FU'nun hem kolesteatom hücrelerine etkilerini gözlemeyi hem de alternatif tedavi molekülleri ile etkilerini karşılaştırmayı hedefledik.

Siklosporin uzun yıllardır organ transplant hastalarında, dermatolojide psoriasis, atopik dermatit gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Kalsinörin inhibitörü olan siklosporin; siklofiline bağlanarak kalsiyum kalmodulin kompleksini inhibe eder, temel etki olarak T hücre cevabını baskılar(99). NFaTc yolağını bloklayan, bir diğer etkisini MAPK sinyal yolağında JNK ve P38 inhibisyonu ile etki gösteren siklosporin önemli bir immunsupresan moleküldür(123). Dermatolojide yaygın kullanımı olan siklosporinin keratinositler üzerine olan etkileri ise tartışmalıdır.

Nickoloff ve ark.(124), Urabe ve ark.(125), Gottlieb ve ark.(126) yaptıkları klinik ve laboratuvar çalışmalarında siklosporinin direkt olarak keratinosit proliferasyonunu inhibe ettiğini saptamışlardır.

Siklosporin kullanılan organ transplant hastalarında skuamoz hücreli kanserlerin görülme sıklığının 65-100 kat artış göstermesi; fakat bazal hücreli kanserler, derinin diğer keratinosit ilişkili maligniteleri, melanomlar ve intestinal tümörlerde bu kadar yüksek artış olmaması, siklosporinin keratinositler üzerine etkilerinin bu kadar basit olmadığını ortaya koymuştur(127). Son yapılan çalışmalarda siklosporinin inhibe ettiği NFaTc yolağının tumor gelişimine karşın koruyucu rolü olduğu saptanmıştır(128). Bu bilgilerden hareketle sistemik siklosporin kullanımının yaratığı immunsupresif etkinin ve kansere karşı koruyucu mekanizmaları baskılamasının, keratinosit proliferasyonuna yol açmasa da tumorogeneze karşı koruyucu mekanizmaları bloklayarak onkojenik etki yarattığı varsayılmaktadır(129). Bu sebeplerle siklosporin yan etki potansiyeli nedeniyle kullanımı konusunda dikkatle karar verilmesi gereken bir moleküldür.

Keratinositler üzerine siklosporinin direkt etkisinin araştırıldığı güncel bir çalışmada HaCaT hücreleri üzerine siklosporinin etkileri incenlemiş ve siklosporinin keratinositlerde proliferasyona veya tumorogeneze direkt olarak sebep olmadığı, keratinosit diferansiyasyonunu artırdığı ve ömrünü uzattığı saptanmıştır. Bununla birlikte hücreler farklı sığır serumuyla oluşturulmuş ortamda siklosporine maruz bırakıldıklarında invaziv pattern kazanmışlardır. Bu da siklosporinin keratinositler için direkt olarak onkojenik aktivite göstermediğini; fakat çevresel faktörlere ve stresörlere hücre cevabını değiştirdiğini kanıtlar niteliktedir(130). Tüm bu bilgiler ışığında siklosporinin keratinositlere etkileri konusunda yanıt bekleyen sorular vardır.

Bildiğimiz kadarıyla, literatürde siklosporinin kolesteatom hücreleri üzerindeki etkisine yönelik çalışma yoktur. Psoriazis ve atopik dermatit gibi cilt rahatsızlıklarında antinflamatuar etkilerinden faydalanılan siklosporinin kolesteatom hücreleri üzerine etkileri çalışmamızda hücre kültür modellemesinde değerlendirilmiştir. Çalışmamızda siklosporin uygulanan kolesteatom hücreleri, kolestetaom 48. saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IL-1, IL-10, Ki-67

düzeyleri ve canlılık yüzdeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde tüm doz gruplarında düşük; IL-6 ise yüksek olarak saptandı. TNF-α düzeyleri de 0,3; 2 ve 10 µg/ml doz gruplarında kolesteatom 48. saat kontrol grubuna kıyasla daha düşük olmasına rağmen bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi. IL-8 düzeyleri incelendiğinde; 0,3 ve 2 µg/ml doz gruplarında yüksek, 10 µg/ml doz grubunda ise kolesteatom 48. saat kontrol grubuna göre düşük saptandı. Siklosporinin sağlıklı keratinositlere olan etkisi de HEKa hücrelerinde incelendi. HEKa hücre 48. saat kontrol grubuna göre IL-1, Ki67, IL-8, IL-10, Ki67 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük; TNF-α ve IL-6 seviyeleri ise yüksek saptandı. Keratinositler üzerine antiproliferatif etkilerini gözlemlediğimiz siklosporinin inflamasyon basamaklarına etkisi ise bu bulgulara göre literatürle uyumlu olarak tartışmalıdır. Çalışmamızda siklosporinin kolesteatom hücrelerinin proliferasyonunu azaltığı, antiinflamatuar ve sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Tüm bu bulgular kolesteatom hücrelerinin ve sağlıklı keratinositlerin Hilton ve ark.(110) çalışması ile uyumlu olarak aynı maddelere nasıl farklı tepki verdiklerini ortaya koymakta; kolesteatomda hücresel cevapların sağlıklı keratinositlerden farklı olduğunu ispatlamaktadır. Her ne kadar kolesteatom keratinosit kaynaklı bir patoloji olsa da kolesteatom hücresi ve keratinositler davranış paterni olarak birbirinden çok farklıdır.

Siklosporinin solüsyon formu ile topikal uygulamasının kolesteatom hücrelerinde bir tedavi umudu olabileceği; fakat ototoksisite ve diğer etkilerine yönelik daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu ortadadır. Sistemik siklosporinin ototoksik etkilerine yönelik Marioni ve ark.(131) yaptıkları çalışmada siklosporin tedavisi sonrası hastalarda işitme kaybı saptanmışken, başka bir güncel çalışmada sistemik siklosporin kullanımının işitme kaybına yol açmadığı savunulmaktadır(132). Bu sebeplerle siklosporinin iç kulağa olan etkilerinin belirlenmesi ve objektif olarak ototoksik potansiyelinin belirlenmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sitokin düzeylerinde; 5-FU'da olduğu gibi IL-6 seviyelerinin tüm doz gruplarında yüksek olarak saptanması komplikasyon kontrolünde bu molekülün de yetersiz olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda siklosporinin sitokin düzeylerine olan etkisinin özellikle MAPK yolağına ve NFκB'ya olan etkileri

sonucunda olduğunu, ileride bu konu konuyla ilgili yapılacak olan çalışmalarda özellikle bu sinyal yolağı ve molekülün incelenmesinin faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Sistemik siklosporine bağlı görülen yan etkiler, siklosporinin efektif topikal formunun oluşturulamaması yeni bir kalsinörin inhibitörü olan ve topikal kullanılabilen takrolimus (FK506)'nın ortaya çıkmasına sebep olmuştur(133). Makrofiline bağlanarak kalsinörin inhibisyonu yapar ve T hücre aracılı cevabı siklosporine benzer şekilde baskılar. Temel etkisini NFaTc yolağını baskılayarak antiinflamatuar olarak gösterir(100, 133). Siklosporin gibi MAPK sinyal yolağını ve NF- κB yolağını da bloklar(134, 135). Siklosporine göre immunsupresif etkisi 100 kata kadar daha potent olan takrolimusun ayrıca yan etki potansiyeli de daha düşüktür(136, 137). Takrolimusun da keratinositler üzerine olan etkileri konusunda bilinmeyen noktalar mevcuttur. Takrolimusun kolesteatom hücrelerine yönelik etkileri üzerine literatürde yeterli çalışma yoktur.

Karashima ve ark.(138) keratinositler üzerine yaptıkları çalışmada takrolimusun keratinosit proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Fakat bunun tersine Shin ve ark.(139) takrolimus tedavisinin insan epidermal keratinositlerinin proliferasyonunu inhibe etmediğini, proliferasyona takrolimusun bir etkisi olmadığını belirtmiştir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde; UVB ile indüklenmiş keratinositlerde takrolimusun NF-κB yolağını baskılayarak TNF-α gibi proinflamatuar sitokin seviyesini düşürdüğü, keratinositler üzerinde direkt etkiyle antiinflamatuar etki de gösterdiği saptanmıştır(140, 141). Takrolimusun bu etkisinin antijen sunucu Langerhans hücrelerinde de olduğu gösterilmiştir(142). TNF-α/IL17 ile NF-κB yolağı üzerinden indüklenmiş keratinositlere takrolimus uygulandıktan sonra proinflamatuar sitokin seviyelerinin belirgin olarak azaldığı da saptanmıştır(143). Mekanizmaları tüm yönleriyle bilinmese de bugün artık takrolimusun keratinositler üzerinde de direkt etkileri olduğu bilinmektedir.

Hong-Qin ve ark.(144) HaCaT hücreleri üzerine yaptıkları bir diğer çalışmada takrolimusun IFN-γ ve bunun indüklediği JAK/STAT yolağını inhibe

ettiği saptanmıştır. Bu çalışma takrolimusun keratinositlerde etkilediği bir diğer yolağı göstermektedir.

LPS ile indüklenmiş keratit vakalarında takrolimusun etkilerinin gözlendiği bir çalışmada insan korneal keratinositleri üzerinde LPS'nin yarattığı inflamatuar etkilerin takrolimus ile inhibe olduğu gösterilmiştir. Takrolimus verilen insan korneal epitel hücrelerinde IL-1, IL-6 gibi proinflamatuar sitokinler azalmış, IL-10 gibi antinflamatuar sitokinler artmış, ek olarak proanjiogenetik sitokinler de azalmıştır(145).

Tüm bu bulguların ışığında; patogenezinde NF-κB, JAK/STAT, MAPK sinyal yolakları, langerhans hücreleri, LPS ile indüklenen kontrolsüz inflamatuar süreçlerin rol aldığı kolesteatomda, takrolimusun alternatif bir tedavi molekülü olabileceğini düşünerek kolesteatom hücre kültürü modellemesinde hücrelere takrolimus uyguladık. Çalışmamızda Takrolimus uygulanan kolesteatom hücrelerinde IL-1, IL-10, Ki67, TNF-α sitokin seviyelerinde kolesteatom 48. saat kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma saptandı. Canlılık yüzdeleri de 10^{-10} M doz grubunda, 10^{-8} ve 10^{-6} M doz gruplarında kolesteatom 48.saat hücre grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olarak ölçüldü. IL-6 düzeyleri de 10^{-6} M ve 10^{-10} M doz gruplarında düşük olarak saptandı; fakat bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi. 10^{-8} M doz grubunda ise kolesteatom 48. saat kontrol grubuna göre IL-6 seviyeleri yüksek saptandı. IL-8 seviyeleri ise tüm doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olarak saptandı. Takrolimus 10^{-6} ve 10^{-10} M doz gruplarında IL-8 haricinde tüm sitokin ve canlılık düzeylerinde düşüş sağlamıştır, yani kolesteatom hücrelerine yönelik güçlü antiinflamatuar, antiproliferatif ve sitotoksik etki göstermiştir. Bu bulgular; siklosporine göre daha potent bir molekül olan, daha az yan etki potansiyeli taşıyan, topikal olarak krem formu bulunan takrolimusun kolesteatomda bir tedavi umudu olabileceğini düşündürmektedir. IL-6 seviyelerinde gözlenen düşüş de siklosporin ve 5-FU'dan farklı saptanmış bir durumdur; fakat bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildir. Komplikasyon kontrolünde de takrolimusun bu moleküllere göre daha başarılı olması muhtemeldir.

Olası ototoksik etkiler ve tedavi etkinliğinin belirlenmesi için kuşkusuz daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Makrolid yapısında olan takrolimusun organ transplant hastalarında sistemik kullanımında ototoksik etkilerini ortaya koyan yayınlar mevcuttur(146, 147). Fakat iç kulaktaki ototoksik etkilerine yönelik objektif veriler sağlayacak çalışmalara ihtiyaç olduğu ortadadır.

Çalışmamızda takrolimusun sağlıklı keratinositlere olan etkilerini de gözledik. Takrolimus uygulanan HEKa hücrelerinde tüm doz gruplarında HEKa 48. saat kontrol grubuna göre IL-1, IL-8, Ki67 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı. IL-6 düzeyleri 10^{-8} ve 10^{-10} M HEKa doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı. 10^{-6} M HEKa doz grubunda ise IL-6 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı. IL-10 düzeyleri 10^{-6} M ve 10^{-8} M HEKa doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı. 10^{-10} M HEKa doz grubunda ise artış gösterdi; fakat bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi. Takrolimus uygulanan tüm HEKa hücrelerinde TNF-α istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek izlendi. Canlılık düzeylerinde ise 10^{-6} M ve 10^{-8} M HEKa doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş izlendi; 10^{-10} M doz grubunda ise canlılık yüzdelerinde HEKa 48. saat kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik saptanmadı. Tüm bu bulgular kolesteatom hücrelerinin ve sağlıklı keratinositlerin aynı maddelere nasıl farklı tepki verdiklerini ortaya koymakta; kolesteatomda hücresel cevapların sağlıklı keratinositlerden farklı olduğunu ispatlamaktadır.

Imiquimod güçlü antitümör ve antiviral etkinliği bilinen, TLR-7 agonisti olarak temel etkisini NF-κB yolağı üzerinden immun cevabı uyararak gerçekleştiren bir ilaçtır(102). Ayrıca imiquimod terapotik fakat yüksek konsantrasyonlarda adenozin reseptörü üzerinden apopitotik etki göstererek hücre proliferasyonunu durdurur(103, 104). İmiquimod, antijen sunucu hücreleri etkileyerek *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*(TRAIL) üzerinden tümör hücrelerinin yok edilmesini de sağlar(148). Tüm bu etkileri sebebiyle imiquimod günümüzde genital siğiller, superfisyal bazal hücreli kanser, aktinik keratoz gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır(148). İmiquimodun keratinositler ve kanser hücreleri üzerindeki etkilerine yönelik çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen; kolesteatom hücreleri üzerindeki etkisine yönelik literatürde çalışma bulunmamaktadır.

Schön ve ark.(103) imiquimodun keratinositler üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında düşük dozda imiquimodun NF-κB uyarımı ile proinflamatuar sitokinleri uyardığını; yüksek dozda ise adenilat siklaz reseptör antagonisti gibi davranarak apopitotik etkilerinin başladığını göstermiştir.

Huang ve ark.(149) yaptığı güncel çalışmada imiquimodun TLR-7'den bağımsız olarak bazal hücreli kanser hücrelerinde p53 üzerinden apopitozu ve tümör hücrelerinin ölümünü indüklediğini göstermiştir.

Jansen ve ark.(150) yaptığı; bazal hücreli kanserde 5-FU ve imiquimodun etkinliğini karşılaştırdıkları çalışmada imiquimodun tedavi sonuçları 5-FU'ya göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha başarılı olarak saptanmıştır.

Mahatma ve ark.(151) da yaptıkları güncel çalışmada superfisyal bazal hücreli kanser tedavisinde imiquimodun etkinliğinin altını çizmişlerdir. Her ne kadar bir kanser olmasa da etyopatogenezdeki benzerlikler bazal hücreli kanser tedavisinde bu kadar başarılı olan, imiquimodu kolesteatomda da potansiyel bir tedavi umudu yapmaktadır.

Kontrolsuz proliferatif ve inflamatuar süreçlerin, antijen sunucu hücre etkileşiminin etyopatogenezinde önemli rol oynadığı kolesteatomda imiquimodun etkisi çalışmamızda bu sebeplerle değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda imiquimod uygulanan kolesteatom hücrelerinde tüm doz gruplarında kolesteatom 48. saat kontrol grubuna göre IL-1, IL-10, Ki67, TNF-α sitokin düzeyleri ve canlılık yüzdeleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. IL-6 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml doz gruplarında kolesteatom 48. saat kontrol grubuna göre yüksek; 50 µg/ml doz grubunda ise düşük saptanmıştır. IL-8 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olarak 5, 10, 20 µg/ml doz gruplarında kolesteatom 48. saat kontrol grubuna göre yüksek; 50 µg/ml doz grubunda ister benzer düzeyde saptanmıştır. İmiquimod 50 µg/ml doz grubu tüm sitokin seviyelerini düşürmüş; sadece IL-8 düzeylerinde kolesteatom 48. saat kontrol grubuna göre benzer etki göstermiştir. Canlılık yüzdelerinde de düşüklük saptanan bu grup kolesteatom hücrelerine karşı güçlü antiinflamatuar, antiproliferatif ve sitotoksik etki göstermiştir. Terapotik fakat yüksek dozda görülen bu etkinin Schön ve ark.(103) çalışmasını desteklediğini düşünmekteyiz. 5, 10 ve 20 µg/ml doz

grubunde görülen IL-6 ve IL-8 yüksekliğinin imiquimodun düşük dozlardaki proinflamatuar etkilerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Çalışmamıza göre terapotik; fakat yüksek dozda imiquimod güçlü antiinflamatuar ve antitümöral etkinlik göstermektedir. Huang ve ark.(145) çalışmasına paralel olarak; her ne kadar bir tümör hücresi olmasa da apopitoz mekanizmalarında görülen bozulmanın etyopatogenezinde önemli rol oynadığı bilinen kolesteatom hücrelerinin; imiquimod etkisi ile proliferasyonunun ve canlılık yüzdelerinin azalması da önemli bir bulgudur. İmiquimod mevcut bulgularla geçmiş çalışmalarla tedavide bir alternatif olarak ortaya çıkan 5-FU'ya göre de daha başarılıdır. Jansen ve ark.(150) yaptığı bazal hücreli kanser tedavisindeki saptanan bu durum kolesteatom hücreleri üzerinde de benzer olarak çalışmamızda görülmüştür. Mevcut bulgularımız ışığında; tüm imiquimod doz grupları arasında, imiquimod 50 µg/ml dozunun antiinflamatuar ve antiproliferatif etkisi nedeniyle güçlü bir tedavi umudu olabileceği düşünülmektedir.

Literatürde sağlıklı keratinositler üzerine inflamatuar ve hiperproliferatif etkileri olan imiquimod(152); çalışmamızda sağlıklı keratinositlere olan etkileri açısından da incelenmiştir. İmiquimod uygulanan tüm HEKa hücre doz gruplarında HEKa 48. saat kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde IL-1, IL-10(5 µg/ml doz grubunda p=0,18), Ki-67 sitokin seviyeleri ve canlılık yüzdeleri azaldı. IL-6 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde 5 µg/ml, 20 µg/ml ve 10 µg/ml doz gruplarında arttı, 50 µg/ml doz grubunda ise azaldı. IL-8 seviyeleri HEKa 48. saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 5 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml doz gruplarında azaldı; 10 µg/ml doz grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı. TNF-α seviyeleri incelendiğinde 5, 20, 50 µg/ml HEKa doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış saptandı. 10 µg/ml doz grubunda da artış görüldü; fakat bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi. Özellikle düşük dozlarda IL-6 ve TNF-α'da görülen yükseklik sağlıklı keratinositler üzerine imiquimodun proinflamatuar etkisini göstermiştir; IL-1 seviyelerinde ise bu ilişki çalışmamızda kurulamamıştır. Bu noktada da HEKa hücreleri ve kolesteatom hücrelerinin aynı ilaca yanıtlarının farklı olması kolesteatomda etyopatogenezinde düşünülen bozulmuş hücre cevabı hipotezini desteklemektedir. Keratinositlerle ilişkili bir hastalık olan kolesteatomda görülen tümorogenez benzeri hücresel cevabın değişmesi ve kontrolsüz hücre cevabının etyopatogenezde çok önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

Sitokin seviyelerinde ve canlılık yüzdelerinde gçsterdiği etkiler sebebiyle önemli bir tedavi alternatifi olarak görülen imiquimodun medikal kullanımının farklı hastalıklarda topikal olması sebebiyle literatürde ototoksik etkilerine yönelik de çalışma yoktur. Tedavi etkinliğinin ve ototoksik etkilerinin belirlenmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kolesteatom etyopatogenezinde moleküler düzeyde veri toplamayı ve alternatif medikal tedavi seçenekleri geliştirmeyi amaçladığımız çalışmamızda elde edilen sonuç ve öneriler aşağıda sunulmuştur:

1) Kolesteatom etyopatogenezinde proinflamatuar sitokinler; özellikle TNF-α ve IL-6 önemli rol oynamaktadır.
2) Bu sitokinlerin etki gösterdiği JAK/STAT, MAPK ve PI3K/Akt(PKB) sinyal yolakları, NFκB proteini ve bunlara bağımlı kinazların etyopatogenezde temel mekanizmayı oluşturduğu düşünülmektedir.
3) Çalışmamızda saptanan IL-10 yüksekliğinin mevcut kontrolsüz inflamasyonu dengelemek amacıyla feedback mekanizmalar ile artış gösterdiği düşünülmektedir.
4) Önemli bir proinflamatuar sitokin olan IL-1 düzeylerinin normal saptanması immun yanıtta bir varyasyon olarak değerlendirilmiştir.
5) IL-8 düzeylerinin sağlıklı hücreler ve kolestetaom hücrelerinde benzer düzeyde izlenmesi, bu sitokinin etyopatogenezde ön planda rol oynamadığını düşündürmektedir.
6) Alternatif medikal tedavi seçenekleri açısından etkinlikleri araştırılan 5-FU, Siklosporin, Takrolimus ve İmiquimod maddelerinin hepsi kolesteatom hücrelerinde uygun dozlarda antinflamatuar, antiproliferatif ve sitotoksik etki göstermiştir.
7) Belirtilen ilaçların etki mekanizmaları düşünüldüğünde bahsedilen sinyal yolaklarının ve NFκB proteininin kolesteatom etyopatogenezinde önemli rol oynadığı bu açıdan da fark edilebilmektedir.
8) Kolesteatom hücreleri üzerine etkileri in vivo ve klinik çalışmalarla kanıtlanan 5-FU ile benzer etkinlik gösteren siklosporin, takrolimus ve imiquimod önemli tedavi alternatifleri olarak saptanmıştır.
9) Siklosporine göre daha spesifik ajanlar olan ve topikal formları bulunan takrolimus ve imiquimodun kolesteatom tedavi etkinliği, yan etkiler açısından ileri çalışmalarda incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.
10) Özellikle İmiquimod 50 µg/ml dozunda tüm sitokinleri baskılaması, antiinflamatuar, antiproliferatif ve sitotoksik etki göstermesi nedeniyle

çalışmamızdaki tüm moleküller arasında öne çıkan potansiyel bir tedavi molekülüdür.

KAYNAKLAR

1. Yung M, Tono T, Olszewska E, Yamamoto Y, Sudhoff H, Sakagami M, et al. EAONO/JOS joint consensus statements on the definitions, classification and staging of middle ear cholesteatoma. J Int Adv Otol. 2017;13(1):1-8.

2. Kemppainen HO, Puhakka HJ, Laippala PJ, Sipilä MM, Manninen MP, Karma PH. Epidemiology and aetiology of middle ear cholesteatoma. Acta oto-laryngologica. 1999;119(5):568-72.

3. Louw L. Acquired cholesteatoma pathogenesis: stepwise explanations. The Journal of Laryngology & Otology. 2010;124(6):587-93.

4. Nevoux J, Lenoir M, Roger G, Denoyelle F, Le Pointe HD, Garabédian E-N. Childhood cholesteatoma. European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases. 2010;127(4):143-50.

5. Presutti L, Anschuetz L, Rubini A, Ruberto M, Alicandri-Ciufelli M, Dematte M, et al. The impact of the Transcanal endoscopic approach and mastoid preservation on recurrence of primary acquired attic cholesteatoma. Otology & neurotology. 2018;39(4):445-50.

6. Kerckhoffs KG, Kommer MB, van Strien TH, Visscher SJ, Bruijnzeel H, Smit AL, et al. The disease recurrence rate after the canal wall up or canal wall down technique in adults. The Laryngoscope. 2016;126(4):980-7.

7. Samy RN, Earl BR, Lipschitz N, Schweinzger I, Currier M, Cripe T. Engineered oncolytic virus for the treatment of cholesteatoma: A pilot in vivo study. Laryngoscope investigative otolaryngology. 2019;4(5):532-42.

8. Maniu A, Harabagiu O, Perde Schrepler M, Cătană A, Fănuţă B, Mogoantă CA. Molecular biology of cholesteatoma. Rom J Morphol Embryol. 2014;55(1):7-13.

9. Derlacki EL, Clemis JD. LX Congenital Cholesteatoma of the Middle Ear and Mastoid. Annals of Otology, rhinology & Laryngology. 1965;74(3):706-27.

10. Gilberto N, Custódio S, Colaço T, Santos R, Sousa P, Escada P. Middle ear congenital cholesteatoma: systematic review, meta-analysis and insights on its pathogenesis. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. 2020;277(4):987-98.

11. Tos M. A new pathogenesis of mesotympanic (congenital) cholesteatoma. The Laryngoscope. 2000;110(11):1890-7.

12. Kuo CL. Etiopathogenesis of acquired cholesteatoma: prominent theories and recent advances in biomolecular research. The Laryngoscope. 2015;125(1):234-40.

13. Xie S, Xiang Y, Wang X, Ren H, Yin T, Ren J, et al. Acquired cholesteatoma epithelial hyperproliferation: roles of cell proliferation signal pathways. The Laryngoscope. 2016;126(8):1923-30.

14. Özgen Z, Seçkin D. Dermatolojik hastalıkların tedavisinde immunmodülasyon. Archives of the Turkish Dermatology & Venerology/Turkderm. 2013.

15. Yamamoto-Fukuda T, Terakado M, Hishikawa Y, Koji T, Takahashi H. Topical application of 5-fluorouracil on attic cholesteatoma results in downregulation of keratinocyte growth factor and reduction of proliferative activity. European archives of oto-rhino-laryngology. 2008;265(10):1173-8.

16. Takahashi H, Funabiki K, Hasebe S, Fukuda-Yamamoto T, Kaieda S, Iwanaga T, et al. Clinical efficacy of 5-fluorouracil (5-FU) topical cream for treatment of cholesteatoma. Auris Nasus Larynx. 2005;32(4):353-7.

17. Iwanaga T, Tanaka F, Tsukasaki N, Terakado M, Kaieda S, Takasaki K, et al. Does topical application of 5-fluorouracil ointment influence inner ear function? Otolaryngology—Head and Neck Surgery. 2006;134(6):961-5.

18. Duverney G. Traité de l'Organe de l'Ouïe. 1683. Paris: Michallet. 1731;183.

19. Müller JP. Ueber den feinern Bau und die Formen der krankhaften Geschwülste, von Dr. Johannes Müller: g. reimer; 1838.

20. Fränzer J-T, Sudhoff H. Middle ear cholesteatoma. e-Neuroforum. 2010;16(1):1-8.

21. Gray JD. The chronic ear: the treatment of cholesteatoma in children. SAGE Publications; 1964.

22. Sade J. Treatment of cholesteatoma and retraction pockets. European archives of oto-rhino-laryngology. 1993;250(4):193-9.

23. Aquino JEAPd, Cruz Filho NA, Aquino JNPd. Epidemiology of middle ear and mastoid cholesteatomas: study of 1146 cases. Brazilian journal of otorhinolaryngology. 2011;77(3):341-7.

24. Tos M. Incidence, etiology and pathogenesis of cholesteatoma in children. Pediatric Otology. 40: Karger Publishers; 1988. p. 110-7.

25. Mills R. Cholesteatoma behind an intact tympanic membrane in adult life: congenital or acquired? The Journal of Laryngology & Otology. 2009;123(5):488-91.

26. Mansour S, Magnan J, Nicolas K, Haidar H. Cholesteatoma. Middle Ear Diseases: Springer; 2018. p. 311-81.

27. Cruveilhier J. Anatomie pathologique du corps humain. 1829.

28. Wittmaack K. Wie entsteht ein genuines Cholesteatom? Archiv für Ohren-, Nasen-und Kehlkopfheilkunde. 1933;137(4):306-32.

29. Jackler RK, Santa Maria PL, Varsak YK, Nguyen A, Blevins NH. A new theory on the pathogenesis of acquired cholesteatoma: mucosal traction. The Laryngoscope. 2015;125:S1-S14.

30. Marchioni D, Alicandri-Ciufelli M, Molteni G, Artioli FL, Genovese E, Presutti L. Selective epitympanic dysventilation syndrome. The Laryngoscope. 2010;120(5):1028-33.

31. Habermann F. Zur Entstehung des Cholesteatoms des Mittelohres. Archiv für Ohrenheilkunde. 1888;27(2-3):230-.

32. Bezold F. Cholesteatom, Perforation der Membrana flaccida shrapnelli und Tubenverschluss. Zeitschr Ohrenheilk. 1890;20:5-28.

33. von Tröltsch AFF. The Diseases of the Ear: Their Diagnosis and Treatment: a Text-book of Aural Surgery in the Form of Academical Lectures: William Wood & Company; 1864.

34. Lepercquel S, Broekaert D, Van Cauwenberge P. Cytokeratin expression patterns in the human tympanic membrane and external ear canal. European archives of oto-rhino-laryngology. 1993;250(2):78-81.

35. Lange W. über die Entstehung der Mittelohrcholesteatome. Z Hals Nas Ohrenheilk. 1925;11:250-71.

36. Akyildiz N, Akbay C, Özgïrgïn ON, Bayramoglu Ï, Sayin N. The role of retraction pockets in cholesteatoma development: an ultrastructural study. Ear, nose & throat journal. 1993;72(3):210-2.

37. Chole RA, Tinling SP. Basal lamina breaks in the histogenesis of cholesteatoma. The Laryngoscope. 1985;95(3):270-5.

38. Bujía J, Holly A, Sudhoff H, Borkowski G, Hildmann H, Koc C, et al. Basement membrane in middle ear cholesteatoma immunohistochemical and ultrastructural observations. Annals of Otology, Rhinology & Laryngology. 1996;105(10):804-10.

39. Hamed MA, Nakata S, Sayed RH, Ueda H, Badawy BS, Nishimura Y, et al. Pathogenesis and bone resorption in acquired cholesteatoma: current knowledge and future prospectives. Clinical and experimental otorhinolaryngology. 2016;9(4):298.

40. Palva T, Ramsay H. Incudal folds and epitympanic aeration. The American journal of otology. 1996;17(5):700-8.

41. Palva T, Ramsay H, Böhling T. Tensor fold and anterior epitympanum. The American journal of otology. 1997;18(3):307-16.

42. Albino AP, Kimmelman CP, Parisier SC. Cholesteatoma: a molecular and cellular puzzle. The American journal of otology. 1998;19(1):7-19.

43. Cheshire I, Blight A, Ratcliffe W, Proops D, Heath D. Production of parathyroid-hormone-related protein by cholesteatoma cells in culture. The Lancet. 1991;338(8774):1041-3.

44. Yoshikawa M, Kojima H, Yaguchi Y, Okada N, Saito H, Moriyama H. Cholesteatoma fibroblasts promote epithelial cell proliferation through overexpression of epiregulin. PLoS One. 2013;8(6).

45. Raynov AM, Choung Y-H, Park HY, Choi SJ, Park K. Establishment and characterization of an in vitro model for cholesteatoma. Clinical and experimental otorhinolaryngology. 2008;1(2):86.

46. Yetiser S, Satar B, Aydin N. Expression of epidermal growth factor, tumor necrosis factor-α, and interleukin-1α in chronic otitis media with or without cholesteatoma. Otology & neurotology. 2002;23(5):647-52.

47. Olszewska E, Wagner M, Bernal-Sprekelsen M, Ebmeyer J, Dazert S, Hildmann H, et al. Etiopathogenesis of cholesteatoma. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology and Head & Neck. 2004;261(1):6-24.

48. Ahn JM, Huang C-C, Abramson M. Interleukin 1 causing bone destruction in middle ear cholesteatoma. Otolaryngology—Head and Neck Surgery. 1990;103(4):527-36.

49. Haruyama T, Furukawa M, Kusunoki T, Onoda J, Ikeda K. Expression of IL-17 and its role in bone destruction in human middle ear cholesteatoma. ORL. 2010;72(6):325-31.

50. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. The American journal of pathology. 2006;169(3):987-98.

51. Kawauchi H. Mucosal Regulatory System for the Balanced Immunity in the Middle Ear and Nasopharynx: Mucosal Immunity of Middle Ear and Nasopharynx. Mucosal Vaccines: Elsevier; 2020. p. 313-21.

52. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. Clinical microbiology reviews. 2009;22(2):240-73.

53. Szczepański M, Szyfter W, Jenek R, Wróbel M, Lisewska IM, Żeromski J. Toll-like receptors 2, 3 and 4 (TLR-2, TLR-3 and TLR-4) are expressed in the microenvironment of human acquired cholesteatoma. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology and Head & Neck. 2006;263(7):603-7.

54. McClure R, Massari P. TLR-dependent human mucosal epithelial cell responses to microbial pathogens. Frontiers in immunology. 2014;5:386.

55. Lee H-Y, Takeshita T, Shimada J, Akopyan A, Woo J-I, Pan H, et al. Induction of beta defensin 2 by NTHi requires TLR2 mediated MyD88 and IRAK-TRAF6-p38MAPK signaling pathway in human middle ear epithelial cells. BMC infectious diseases. 2008;8(1):87.

56. Hirai H, Kariya S, Okano M, Fukushima K, Kataoka Y, Maeda Y, et al. Expression of toll-like receptors in chronic otitis media and cholesteatoma. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2013;77(5):674-6.

57. Si Y, Zhang Z, Huang C, He J, Feng L, Chen Y, et al. Differential expression of toll-like receptors in chronic suppurative otitis media and cholesteatoma. Zhonghua er bi yan hou tou jing wai ke za zhi= Chinese journal of otorhinolaryngology head and neck surgery. 2012;47(5):388-93.

58. Gu X, Keyoumu Y, Long L, Zhang H. Detection of bacterial biofilms in different types of chronic otitis media. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. 2014;271(11):2877-83.

59. Chole RA, Faddis BT. Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas. Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery. 2002;128(10):1129-33.

60. Nason R, Jung JY, Chole RA. Lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis from mononuclear precursors: a mechanism for osteolysis in chronic otitis. Journal of the Association for Research in Otolaryngology. 2009;10(2):151-60.

61. Chung JH, Lee SH, Park CW, Kim KR, Tae K, Kang S-H, et al. Expression of apoptotic vs antiapoptotic proteins in middle ear cholesteatoma. Otolaryngology–Head and Neck Surgery. 2015;153(6):1024-30.

62. Friedland DR, Eernisse R, Erbe C, Gupta N, Cioffi JA. Cholesteatoma growth and proliferation: post-transcriptional regulation by microRNA-21. Otology & neurotology: official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology. 2009;30(7):998.

63. Zhang W, Chen X, Qin Z. MicroRNA let-7a suppresses the growth and invasion of cholesteatoma keratinocytes. Molecular medicine reports. 2015;11(3):2097-103.

64. Osaki M, Oshimura Ma, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. Apoptosis. 2004;9(6):667-76.

65. Jin BJ, Min HJ, Jeong JH, Park CW, Lee SH. Expression of EGFR and microvessel density in middle ear cholesteatoma. Clinical and experimental otorhinolaryngology. 2011;4(2):67.

66. Jutten B, Rouschop K. EGFR signaling and autophagy dependence for growth, survival, and therapy resistance. Cell cycle. 2014;13(1):42-51.

67. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science. 1998;282(5392):1318-21.

68. Garg A, Aggarwal B. Nuclear transcription factor-κB as a target for cancer drug development. Leukemia. 2002;16(6):1053-68.

69. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. Journal of cellular and molecular medicine. 2005;9(1):59-71.

70. Liu W, Yin T, Ren J, Li L, Xiao Z, Chen X, et al. Activation of the EGFR/Akt/NF-κB/cyclinD1 survival signaling pathway in human cholesteatoma epithelium. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. 2014;271(2):265-73.

71. Yune TY, Byun JY. Expression of PTEN and phosphorylated Akt in human cholesteatoma epithelium. Acta oto-laryngologica. 2009;129(5):501-6.

72. He Y-Y, Council SE, Feng L, Chignell CF. UVA-induced cell cycle progression is mediated by a disintegrin and metalloprotease/epidermal growth factor receptor/AKT/Cyclin D1 pathways in keratinocytes. Cancer research. 2008;68(10):3752-8.

73. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. Biochemical Journal. 2010;429(3):403-17.

74. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. Expert opinion on therapeutic targets. 2012;16(1):103-19.

75. Bubici C, Papa S. JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. British journal of pharmacology. 2014;171(1):24-37.

76. Huisman MA, De Heer E, Grote JJ. Survival signaling and terminal differentiation in cholesteatoma epithelium. Acta oto-laryngologica. 2007;127(4):424-9.

77. Huisman MA, De Heer E, Grote JJ. Terminal differentiation and mitogen-activated protein kinase signaling in human cholesteatoma epithelium. Otology & Neurotology. 2006;27(3):422-6.

78. Huisman MA, De Heer E, Grote JJ. Sustained extracellular signal-regulated kinase1/2 mitogen-activated protein kinase signalling is related to increased p21 expression in cholesteatoma epithelium. Acta oto-laryngologica. 2005;125(2):134-40.

79. Liu W, Xie S, Chen X, Rao X, Ren H, Hu B, et al. Activation of the IL-6/JAK/STAT3 signaling pathway in human middle ear cholesteatoma epithelium. International journal of clinical and experimental pathology. 2014;7(2):709.

80. Fukudome S, Wang C, Hamajima Y, Ye S, Zheng Y, Narita N, et al. Regulation of the angiogenesis of acquired middle ear cholesteatomas by inhibitor of DNA binding transcription factor. JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery. 2013;139(3):273-8.

81. Zhang Q-A, Hamajima Y, Zhang Q, Lin J. Identification of Id1 in acquired middle ear cholesteatoma. Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery. 2008;134(3):306-10.

82. Kato M, Slack FJ. microRNAs: small molecules with big roles–C. elegans to human cancer. Biology of the Cell. 2008;100(2):71-81.

83. Chen X, Qin Z. Post-transcriptional regulation by microrna-21 and let-7a microRNA in paediatric cholesteatoma. Journal of International Medical Research. 2011;39(6):2110-8.

84. Chen X, Li X, Qin Z. MicroRNA-21 promotes the proliferation and invasion of cholesteatoma keratinocytes. Acta oto-laryngologica. 2016;136(12):1261-6.

85. Li N, Qin Z-B. Inflammation-induced miR-802 promotes cell proliferation in cholesteatoma. Biotechnology letters. 2014;36(9):1753-9.

86. Xie S, Liu X, Pan Z, Chen X, Peng A, Yin T, et al. Microarray Analysis of Differentially-expressed MicroRNAs in Acquired Middle Ear Cholesteatoma. International journal of medical sciences. 2018;15(13):1547.

87. Gong N, Zhu W, Xu R, Teng Z, Deng C, Zhou H, et al. Keratinocytes-derived exosomal miRNA regulates osteoclast differentiation in middle ear cholesteatoma. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2020.

88. Ceccarelli S, Romano F, Angeloni A, Marchese C. Potential dual role of KGF/KGFR as a target option in novel therapeutic strategies for the treatment of cancers and mucosal damages. Expert opinion on therapeutic targets. 2012;16(4):377-93.

89. Zhang Y-m, Zhang Z-q, Liu Y-y, Zhou X, Shi X-h, Jiang Q, et al. Requirement of Gαi1/3–Gab1 Signaling Complex for Keratinocyte Growth Factor–Induced PI3K–AKT–mTORC1 Activation. Journal of Investigative Dermatology. 2015;135(1):181-91.

90. Hadari Y, Gotoh N, Kouhara H, Lax I, Schlessinger J. Critical role for the docking-protein FRS2α in FGF receptor-mediated signal transduction pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001;98(15):8578-83.

91. Yamamoto-Fukuda T, Akiyama N, Shibata Y, Takahashi H, Ikeda T, Koji T. In vivo over-expression of KGF mimic human middle ear cholesteatoma. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. 2015;272(10):2689-96.

92. Yamamoto-Fukuda T, Takahashi H, Terakado M, Hishikawa Y, Koji T. Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in noncholesteatomatous and cholesteatomatous chronic otitis media. Otology & Neurotology. 2010;31(5):745-51.

93. Yamamoto-Fukuda T, Akiyama N, Shibata Y, Takahashi H, Ikeda T, Kohno M, et al. KGFR as a possible therapeutic target in middle ear cholesteatoma. Acta oto-laryngologica. 2014;134(11):1121-7.

94. Hunter JB, Zuniga MG, Sweeney AD, Bertrand NM, Wanna GB, Haynes DS, et al. Pediatric endoscopic cholesteatoma surgery. Otolaryngology–Head and Neck Surgery. 2016;154(6):1121-7.

95. Grem JL. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. Investigational new drugs. 2000;18(4):299-313.

96. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nature reviews cancer. 2003;3(5):330-8.

97. Kamel SB. Clinical effect of topical use of 5-flurouracil in the management of discharging post-mastoidectomy cavity. Life Science Journal. 2013;2:10.

98. Funabiki K, Takahashi H, Hasebe S, Honjo I. Treatment of outer and middle ear cholesteatoma using 5-FU topical cream—a preliminary report. Otol Jpn. 1998;8:479.

99. Amor KT, Ryan C, Menter A. The use of cyclosporine in dermatology: part I. Journal of the American Academy of Dermatology. 2010;63(6):925-46.

100. Wollenberg A, Sharma S, von Bubnoff D, Geiger E, Haberstok J, Bieber T. Topical tacrolimus (FK506) leads to profound phenotypic and functional alterations of epidermal antigen-presenting dendritic cells in atopic dermatitis. Journal of allergy and clinical immunology. 2001;107(3):519-25.

101. Eedy D. Imiquimod: a potential role in dermatology? British Journal of Dermatology. 2002;147(1):1-6.

102. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88–dependent signaling pathway. Nature immunology. 2002;3(2):196-200.

103. Schön MP, Schön M, Klotz K-N. The small antitumoral immune response modifier imiquimod interacts with adenosine receptor signaling in a TLR7-and TLR8-independent fashion. Journal of investigative dermatology. 2006;126(6):1338-47.

104. Schön M, Schön M. Immune modulation and apoptosis induction: two sides of the antitumoral activity of imiquimod. Apoptosis. 2004;9(3):291-8.

105. Raffa S, Leone L, Scrofani C, Monini S, Torrisi MR, Barbara M. Cholesteatoma-associated fibroblasts modulate epithelial growth and differentiation through KGF/FGF7 secretion. Histochemistry and cell biology. 2012;138(2):251-69.

106. Xiao T, Kagami S, Saeki H, Sugaya M, Kakinuma T, Fujita H, et al. Both IL-4 and IL-13 inhibit the TNF-α and IFN-γ enhanced MDC production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. Journal of dermatological science. 2003;31(2):111-7.

107. Furue M, Gaspari AA, Katz SI. The effect of cyclosporin A on epidermal cells. II. Cyclosporin A inhibits proliferation of normal and transformed keratinocytes. Journal of investigative dermatology. 1988;90(6):796-800.

108. Rotolo S, Ceccarelli S, Romano F, Frati L, Marchese C, Angeloni A. Silencing of keratinocyte growth factor receptor restores 5-fluorouracil and tamoxifen efficacy on responsive cancer cells. PloS one. 2008;3(6).

109. Kuczkowski J, Sakowicz-Burkiewicz M, Iżycka-Świeszewska E, Mikaszewski B, Pawełczyk T. Expression of tumor necrosis factor-α, interleukin-1α, interleukin-6 and interleukin-10 in chronic otitis media with bone osteolysis. ORL. 2011;73(2):93-9.

110. Hilton CW, Ondrey FG, Wuertz BR, Levine SC. Interleukin-8 production in response to tumor necrosis factor-alpha by cholesteatoma keratinocytes in cell culture. The Laryngoscope. 2011;121(2):372-4.

111. Britze A, Palmfeldt J, Gregersen N, Ovesen T. 44-plex cytokine profile of cholesteatoma. Acta oto-laryngologica. 2014;134(1):41-50.

112. Surarto B, Purnami N, Hutahaen F, Mahardhika MR. The Association of IL-1 Alpha Level and TNF Alpha Expressions on Bone Destruction in Chronic Suppurative Otitis Media and Cholesteatoma. Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery. 2020;72(1):1-7.

113. Imai R, Sato T, Iwamoto Y, Hanada Y, Terao M, Ohta Y, et al. Osteoclasts Modulate Bone Erosion in Cholesteatoma via RANKL Signaling. Journal of the Association for Research in Otolaryngology. 2019;20(5):449-59.

114. Kuczkowski J, Nowicki TK, Starzyńska A. Why does the acquired cholesteatoma trigger resorption of the temporal bone? European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. 2017;274(12):4251-2.

115. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. Chromosoma. 2018;127(2):175-86.

116. Sobecki M, Mrouj K, Colinge J, Gerbe F, Jay P, Krasinska L, et al. Cell-cycle regulation accounts for variability in Ki-67 expression levels. Cancer research. 2017;77(10):2722-34.

117. Gil RS, Vagnarelli P. Ki-67: more hidden behind a ‘classic proliferation marker’. Trends in biochemical sciences. 2018;43(10):747-8.

118. Mallet Y, Nouwen J, Lecomte-Houcke M, Desaulty A. Aggressiveness and quantification of epithelial proliferation of middle ear cholesteatoma by MIB1. The Laryngoscope. 2003;113(2):328-31.

119. Sikka K, Sharma S, Thakar A, Dattagupta S. Evaluation of epithelial proliferation in paediatric and adult cholesteatomas using the Ki-67 proliferation marker. The Journal of Laryngology & Otology. 2012;126(5):460-3.

120. Aslıer M, Erdag TK, Sarioglu S, Güneri EA, Ikiz AO, Uzun E, et al. Analysis of histopathological aspects and bone destruction characteristics in acquired middle ear cholesteatoma of pediatric and adult patients. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2016;82:73-7.

121. Server EA, Ertugay ÇK, Koca SB, Longur ES, Yiğit Ö, Demirhan H, et al. Predictive Role of Ki-67 and Proliferative-Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Recurrent Cholesteatoma. The journal of international advanced otology. 2019;15(1):38.

122. Hamed MA, Nakata S, Shiogama K, Suzuki K, Sayed RH, Nishimura Y, et al. Cytokeratin 13, Cytokeratin 17, and Ki-67 expression in human acquired cholesteatoma and their correlation with its destructive capacity. Clinical and experimental otorhinolaryngology. 2017;10(3):213.

123. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. Immunopharmacology. 2000;47(2-3):119-25.

124. Nickoloff B, Fisher G, Mitra R, Voorhees J. Additive and synergistic antiproliferative effects of cyclosporin A and gamma interferon on cultured human keratinocytes. The American journal of pathology. 1988;131(1):12.

125. Urabe A, Kanitakis J, Viac J, Thivolet J. Cyclosporin A inhibits directly in vivo keratinocyte proliferation of living human skin. Journal of investigative dermatology. 1989;92(5):755-7.

126. Gottlieb SL, Heftler NS, Gilleaudeau P, Johnson R, Vallat VP, Wolfe J, et al. Short-contact anthralin treatment augments therapeutic efficacy of cyclosporine in psoriasis: a clinical and pathologic study. Journal of the American Academy of Dermatology. 1995;33(4):637-45.

127. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin cancers after organ transplantation. New England Journal of Medicine. 2003;348(17):1681-91.

128. Wu X, Nguyen B-C, Dziunycz P, Chang S, Brooks Y, Lefort K, et al. Opposing roles for calcineurin and ATF3 in squamous skin cancer. Nature. 2010;465(7296):368-72.

129. Wheless L, Jacks S, Potter KAM, Leach BC, Cook J. Skin cancer in organ transplant recipients: more than the immune system. Journal of the American Academy of Dermatology. 2014;71(2):359-65.

130. Schardt L. The impact of Cyclosporine A on human epidermal keratinocytes 2018.

131. Marioni G, Perin N, Tregnaghi A, Bellemo B, Staffieri A, De Filippis C. Progressive bilateral sensorineural hearing loss probably induced by chronic cyclosporin A treatment after renal transplantation for focal glomerulosclerosis. Acta oto-laryngologica. 2004;124(5):603-7.

132. Kasap-Demir B, Özmen D, Kırkım G, Doğan E, Soylu A, Şerbetçioğlu B, et al. Cyclosporine causes no hearing defect in paediatric patients with nephrotic syndrome. International Journal of Audiology. 2017;56(9):701-5.

133. Gupta A, Adamiak A, Chow M. Tacrolimus: a review of its use for the management of dermatoses. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2002;16(2):100-14.

134. Matsuda S, Shibasaki F, Takehana K, Mori H, Nishida E, Koyasu S. Two distinct action mechanisms of immunophilin–ligand complexes for the blockade of T-cell activation. EMBO reports. 2000;1(5):428-34.

135. Frantz B, Nordby EC, Bren G, Steffan N, Paya CV, Kincaid RL, et al. Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B. The EMBO journal. 1994;13(4):861-70.

136. Ochiai T, Nakajima K, Sakamoto K, Nagata M, Gunji Y, Asano T, et al., editors. Comparative studies on the immunosuppressive activity of FK506, 15-deoxyspergualin, and cyclosporine. Transplantation proceedings; 1989.

137. Prasad N, Manjunath R, Rangaswamy D, Jaiswal A, Agarwal V, Bhadauria D, et al. Efficacy and safety of cyclosporine versus tacrolimus in steroid and cyclophosphamide resistant nephrotic syndrome: A prospective study. Indian journal of nephrology. 2018;28(1):46.

138. Karashima T, Hachisuka H, Sasai Y. FK506 and cyclosporin A inhibit growth factor-stimulated human keratinocyte proliferation by blocking cells in the G0G1 phases of the cell cycle. Journal of dermatological science. 1996;12(3):246-54.

139. Shin JM, Choi DK, Sohn KC, Lee Y, Kim CD, Lee J-H, et al. The effect of FK 506 on the reepithelialization of superficial skin wound. Annals of dermatology. 2017;29(5):635-7.

140. Lan CC, Yu HS, Wu CS, Kuo HY, Chai CY, Chen GS. FK506 inhibits tumour necrosis factor-α secretion in human keratinocytes via regulation of nuclear factor-κB. British Journal of Dermatology. 2005;153(4):725-32.

141. Wu C-S, Lan C-CE, Kuo H-Y, Chai C-Y, Chen W-T, Chen G-S. Differential regulation of nuclear factor-kappa B subunits on epidermal keratinocytes by ultraviolet B and tacrolimus. The Kaohsiung journal of medical sciences. 2012;28(11):577-85.

142. Xu J, Feng Y, Song G, Gong Q, Yin L, Hu Y, et al. Tacrolimus reverses UVB irradiation-induced epidermal Langerhans cell reduction by inhibiting TNF-α secretion in keratinocytes via regulation of NF-κB/p65. Frontiers in pharmacology. 2018;9:67.

143. Hu Y, Guo J, Yin L, Tu J, Yin Z. Tacrolimus Inhibits TNF-α/IL-17A-Produced pro-Inflammatory Effect on Human Keratinocytes by Regulating IκBζ. Inflammation. 2019:1-9.

144. Hong-Qin T, Xin-Yu L, Mei-Yu T, Ji-Wei G, Lan-Fang X, Zhi-Qiang C, et al. Effects of tacrolimus on IFN-γ signaling in keratinocytes: possible mechanisms by which tacrolimus affects IFN-γ-dependent skin inflammation. European Journal of Dermatology. 2011;21(1):22-31.

145. Yu Y, Zhong J, Peng L, Wang B, Li S, Huang H, et al. Tacrolimus downregulates inflammation by regulating pro-/anti-inflammatory responses in LPS-induced keratitis. Molecular medicine reports. 2017;16(5):5855-62.

146. Favrelière S, Delaunay P, Lebreton JP, Rouby F, Atzenhoffer M, Lafay-Chebassier C, et al. Drug-induced hearing loss: a case/non-case study in the French pharmacovigilance database. Fundamental & Clinical Pharmacology. 2020.

147. Gertson K, Hayashi SS, Trinkaus K, Wan F, Hayashi RJ. Prevalence of Ototoxicity Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Pediatric Patients. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2020;26(1):107-13.

148. Stary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T, Stingl G. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. The Journal of experimental medicine. 2007;204(6):1441-51.

149. Huang S-W, Chang S-H, Mu S-W, Jiang H-Y, Wang S-T, Kao J-K, et al. Imiquimod activates p53-dependent apoptosis in a human basal cell carcinoma cell line. Journal of dermatological science. 2016;81(3):182-91.

150. Jansen MH, Mosterd K, Arits AH, Roozeboom MH, Sommer A, Essers BA, et al. Five-year results of a randomized controlled trial comparing effectiveness of photodynamic therapy, topical imiquimod, and topical 5-fluorouracil in patients with superficial basal cell carcinoma. Journal of Investigative Dermatology. 2018;138(3):527-33.

151. Mahatma G, Sweeney AR, Yen MT. Imiquimod for Superficial Basal Cell Carcinomas. International Ophthalmology Clinics. 2020;60(2):3-11.

152. Moos S, Mohebiany AN, Waisman A, Kurschus FC. Imiquimod-induced psoriasis in mice depends on the IL-17 signaling of keratinocytes. Journal of Investigative Dermatology. 2019;139(5):1110-7.