

Tekrarlayan kolesteatomlu olgularda Ki-67 ekspresyonunun değerlendirilmesi

Evaluation of Ki-67 expression in recurrent cases of cholesteatoma

Dr. Arif ŞANLI,¹ Dr. İlter TEZER,¹ Dr. Mustafa PAKSOY,¹ Dr. Sedat AYDIN,¹
Dr. Ümit HARDAL,¹ Dr. Nagehan Barşık ÖZDEMİR²

Amaç: Kolesteatom tedavisinde uygun cerrahi tekniklere rağmen nüks izlenmesi günümüzde hala bir sorundur. Bu çalışmada, tekrarlayan kolesteatomlarda Ki-67 ekspresyonunun düzeyi araştırıldı.

Hastalar ve Yöntemler: Çalışmaya, otitis media nedeniyle ameliyat edilen 32 hasta (18 erkek, 14 kadın; ort yaş 34; dağılım 12-63) alındı. Olguların 19'u kolesteatomlu, sekizi tekrarlayan kolesteatomlu kronik otitis media nedeniyle ameliyat edildi. Kronik otitis media nedeniyle timpanoplasti yapılan beş hasta ise kontrol grubu olarak ayrıldı. Kolesteatomlu hastaların hepsine radikal mastoidektomi yapıldı. Ameliyat sırasında kolesteatom dokusundan alınan parçalar immünohistokimyasal boyama işlemi için hazırlandı. Kontrol grubunda retroauriküler deri örnekleri kullanıldı. Ki-67 belirteci kullanılarak, kolesteatomlu iki hasta grubu karşılaştırıldı.

Bulgular: Kontrol grubuna göre, kolesteatomlu her iki grupta hücresel proliferasyonda artış saptandı. Ki-67 boyanma yüzdeleri açısından, kolesteatomlu iki grup arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Kolesteatomlu grupta Ki-67 değerleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ($p<0.05$), bu anlamlı farklılık tekrarlayan kolesteatomlu grup ile kontrol grubu arasında ileri derecedeydi ($p<0.01$).

Sonuçlar: Bulgularımız, tekrarlayan kolesteatomda proliferasyon artışı belirgin olmasına rağmen, kolesteatom tedavi başarısızlığının daha çok cerrahi tekniğe, enfeksiyon varlığına ve kolesteatom tipine bağlı olabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Sözcükler: Kolesteatom, orta kulak; Ki-67 antijeni; immünohistokimya.

Objectives: Recurrences are still a challenge despite appropriate techniques in cholesteatoma surgery. This study was designed to evaluate the level of Ki-67 expression in recurrent cases of cholesteatoma.

Patients and Methods: The study included 32 patients (18 males, 14 females; mean age 34 years; range 12 to 63 years) who underwent surgery for otitis media. Of these, 19 patients had cholesteatoma, and eight patients had recurrent cholesteatoma. Five patients who underwent tympanoplasty for chronic otitis media comprised the control group. All the patients with cholesteatoma underwent radical mastoidectomy. At surgery, tissue samples of cholesteatoma were taken and prepared for immunohistochemical staining. In controls, retroauricular skin samples were used. The two patient groups with cholesteatoma were compared with respect to Ki-67 expression.

Results: Increased cellular proliferation was detected in both groups of cholesteatoma. No significant difference was found between two cholesteatoma groups with respect to Ki-67 staining ($p>0.05$). Compared to the controls, patients with cholesteatoma and those with recurrent cholesteatoma had significantly higher levels of Ki-67 staining ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively).

Conclusion: Our results suggest that, despite a higher degree of proliferation in recurrent cholesteatoma cases, treatment failures may be mainly associated with the surgical technique, accompanying infections, and the type of cholesteatoma.

Key Words: Cholesteatoma middle ear; Ki-67 antigen; immunohistochemistry.

- ♦ Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ¹2. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Kliniği, ²Patoloji Kliniği (Department of Otolaryngology and Pathology, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Training and Research Hospital), İstanbul, Turkey.
- ♦ Dergiye geliş tarihi - 25 Nisan 2005 (Received - April 25, 2005). Düzeltme isteği - 3 Aralık 2005 (Request for revision - December 3, 2005). Yayın için kabul tarihi - 21 Haziran 2006 (Accepted for publication - June 21, 2006).
- ♦ İletişim adresi (Correspondence): Dr. Ümit Hardal. Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Kliniği, 34865 Cevizli, İstanbul, Turkey. Tel: +90 216 - 441 39 00 / 1531 Faks (Fax) : +90 216 - 352 00 83 e-posta (e-mail): umit9547@hotmail.com

Kolesteatom, temporal kemikte sık olarak rastlanan orta kulak hastalığıdır. Kolesteatom epiteli, keratinosit disregülasyonu ile karakterize olup, aşırı büyüme göstermesi sonucunda orta kulak mukozasında harabiyetle sonuçlanan bir patolojidir. Histopatolojik olarak benign olmasına rağmen, klinik olarak destrüktiftir. Orta kulak kolesteatomunun patogenezinde, epitelyal hücre migrasyonu, proliferasyonu ve diferansiasyonu rol oynamaktadır.^[1]

Ki-67 çoğalan hücrelerde görülen bir çekirdek proteini. Esas olarak G₁, S, M ve G₂ fazında görülür. G₀ fazında yoktur. Hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi bir şekilde gösteren protein olup, mitotik indeks ve tümör derecelendirmesinde sıklıkla kullanılır.^[2]

Ki-67 proteini ilk defa Gerdes ve ark.^[3] tarafından, kobayı Hodgkin lenfoma hücreleri ile immünize etmeleri sonucu, 1983 yılında tarif edilmiştir. Bu protein çoğalan bütün hücrelerde izlenmiştir. İncelenen hücrelerde çoğalma gösteren bölümü araştırmada kullanılan önemli bir belirteç haline gelmiştir.

İnsan Ki-67 proteinine karşı antikorların mikroenjeksiyonu sonrasında hücre bölünmesinde azalma olduğu görülmüş, bu bulguya göre Ki-67'nin hücre proliferasyonunda önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır.^[4]

Kolesteatom cerrahi olarak tedavi edilmesine rağmen, tekrarlama özelliği göstermesi nedeniyle klinik açıdan günümüzde hala bir sorundur. Konuyla ilgili yapılan çalışmalarda çeşitli immünolojik parametrelere bakılarak kolesteatom biyomekaniği hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

Çalışmamızda, kolesteatomlu otitis media nedeniyle ameliyat edilen hastalardan ameliyat öncesinde alınan kolesteatom örneklerinde mitotik aktivite araştırılarak, Ki-67 belirteci açısından nüks gelişen ve gelişmeyen olgular karşılaştırıldı.

HASTALAR VE YÖNTEMLER

Çalışmaya, Ocak 2000-Ocak 2004 tarihleri arasında otitis media nedeniyle ameliyat edilen 32 hasta (18 erkek, 14 kadın; ort yaş 34; dağılım 12-63) alındı.

Olguların 19'u kolesteatomlu, sekizi tekrarlayan kolesteatomlu kronik otitis media nedeniyle ameliyat edildi. Kronik otitis media nedeniyle timpanoplasti yapılan beş hasta ise kontrol grubu olarak ayrıldı.

Kolesteatomlu hastalarda sinüs timpani, epitimpanum, fasiyal reses ve antrum tutulumu vardı. Tüm olgulara radikal mastoidektomi yapıldı. Yassı epitelin yerleştiği tüm mastoid hücreler, epitimpanum, sinüs timpani temizlendi; stapesin intakt ve fonksiyonel olduğu 14 olgu dışında tüm kemikçiklerde harabiyet ve nekroz vardı.

Ameliyatlar aynı cerrahi ekip tarafından yapıldı ve takip edildi. Attikte sınırlı olgular ve kapalı teknik uygulanan veya başka hastanelerde yapılan ameliyattan sonra nüks gelişen hastalar çalışma dışı bırakıldı.

Hastalar ameliyat sonrası 7, 10, 15. günler, 1. ay ve 3. aydaki kontrollerden sonra altı aylık aralıklarla takip edildi.

Ameliyat sırasında kolesteatom dokusundan parçalar alınıp formolle fikse edilerek patoloji bölümüne gönderildi. Kontrol grubu olarak timpanoplasti ameliyatı olan hastalardan retroauriküler deri örnekleri alındı.

İmmünohistokimyasal boyama

Çalışmaya alınan olgularda Ki-67 ekspresyonunu belirlemek amacıyla, parafin bloklardan 5 mikrometre kalınlığında hazırlanan kesitler 'Poly- L-Lysine'li lamlara alındı. Ki-67 (SP6) (Neomarkers, ABD) için, kullanıma hazır tavşan monoklonal antikoru ile immünohistokimyasal boyama işlemi uygulandı.

Etüvde bütün gece 37 derecede bırakılan kesitler, ertesi gün 60 derecede 60 dakika bekletildi. Deparfinizasyon amacıyla kesitler üç kez, beşer dakika ksilende ve iki kez, onar dakika absölu alkolde bekletildi. Rehidratasyon için bir dakika distile suda bekletildi. Distile su ile 1/10 oranında sulandırılan antijen retrieval solüsyonu (sitrat buffer), önce mikrodalgada 750 watt'ta iki dakika, sonra 350 watt'ta 30 saniye bekletildi. Daha sonra 15 dakika boyunca beşer saniye aralarla 160 watt'ta 30 saniye bekletildi. Mikrodalgadan çıkarılan kesitler oda sıcaklığında yirmi dakika tutulduktan sonra distile su ile yıkanıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için, %3'lük hidrojen peroksit ile 20 dakika inkübe edildi.

Kesitler distile su ile iki kez birer dakika yıkanıldı. Ki-67 monoklonal antikoru ile oda sıcaklığında 90 dakika inkübe edildi. PBS (phosphate-buffered saline) ile üç kez beşer dakika yıkandıktan sonra, HRP AEC yöntemi ile rutin boyama işlemi tamamlandı.

TABLO I

GRUPLARIN Ki-67 BOYANMA ORANLARINA GÖRE KARŞILAŞTIRILMASI

Gruplar	Ki-67 boyanma yüzdeleri	
	Medyan	Ort±SS
Normal kolesteatom (1)	17.98	19.71±13.20
Tekrarlayan kolesteatom (2)	11.89	24.64±21.41
Kontrol grubu (3)	4.30	4.67±1.30

Grup 1 ve 2 için p= 0.735; grup 1 ve 3 için p=0.011; grup 2 ve 3 için p=0.007.

İmmünohistokimyasal değerlendirme

Ki-67 boyanma paterni değerlendirilirken, Buja ve ark.nın^[5] yöntemi esas alındı. Değerlendirmeye alınan lamalar üzerinde 400 yüksek büyütme alanında 150 ile 500 hücre sayıldı. Ki-67 nükleer boyanma gösteren hücrelerin sayısının, toplam hücre sayısına oranı yüzde olarak hesaplandı.

İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel analizler için SPSS for Windows 10.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken, tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerin (ortalama, standart sapma) yanı sıra, niceliksel verilerin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi ve Mann-Whitney U-testi kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise ki-kare testi ve Fisher kesin ki-kare testi kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık p<0.05 düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kolesteatomlu her iki grupta hücresel proliferasyonda artış saptandı (Şekil 1).

Kolesteatomlu, tekrarlayan kolesteatomlu ve sadece kronik otitis medialis hasta gruplarında Ki-67 boyanma yüzdeleri Tablo I'de gösterildi. Ki-67 boyanma yüzdeleri açısından, kolesteatomlu iki grup arasında anlamlı farklılık bulunmazken (p>0.05), kolesteatomlu gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık vardı. Kolesteatomlu grupta Ki-67 değerleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunurken (p<0.05), bu anlamlı farklılık tekrarlayan kolesteatomlu grup ile kontrol grubu arasında ileri derecedeydi (p<0.01).

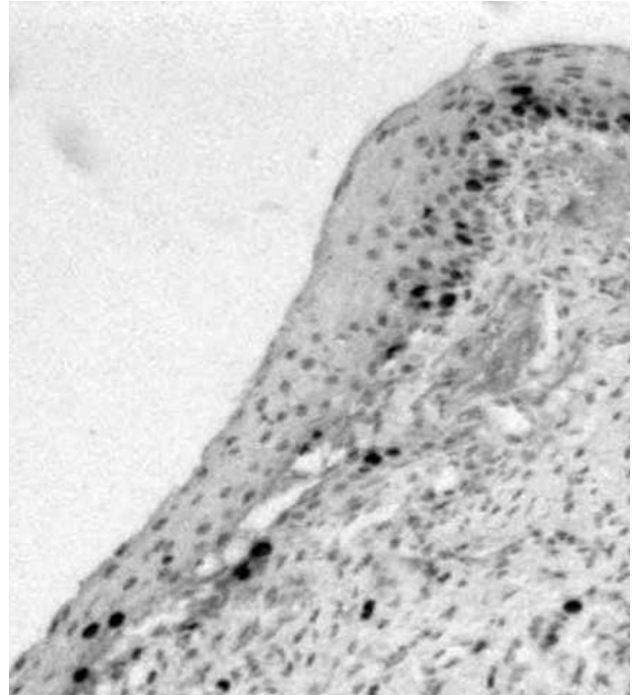
TARTIŞMA

Kolesteatom, hiperproliferatif epitelin keratin ile birlikte progresif olarak birikimiyle karakterize, be-

nign olmasına rağmen yıkıcı zararlara yol açan bir orta kulak patolojisidir.^[4] Keratinositlerin büyümesi, kontrollü hücre proliferasyonu ve programlanmış hücre ölümünün birlikteliği sayesinde meydana gelir. Bununla beraber kolesteatomda bu sürecin dengeli birlikteliği bozulmuştur. Daha önceki çalışmalarda kolesteatom epitelindeki proliferasyon gösteren hücrelerin dağınık halde oldukları ve proliferasyon belirteç düzeylerinin artmış olduğu gösterilmiştir.^[6,7]

Kolesteatomda, büyüme, sağlıklı dokuya invazyon, migrasyon, agresiflik ve düzenli olmayan farklılaşma başlıca klinik-histopatolojik özellikler olarak görülebilir.

Histopatogenezi hala tam olarak anlaşılammış olan kolesteatom otolarenjolojide hala önemli bir sorundur. Oluşumu konusunda çeşitli teoriler ortaya atılmasına rağmen tam olarak anlaşılması değildir. Konuyla ilgili yapılan araştırmalarda çeşitli faktörler üzerinde durulmuştur. Enflamatuvar parametreler için interlökinler, büyüme faktörleri (TGF-alfa, EGF, vb.); mitotik faktörler olarak Ki-67 (MIB1), PCNA, p27/Kip1, p21, p53, aktif caspase 3, kollajen 4; epitelial belirteç olarak filaggrin, sirokeratin, Ber-Ep4, EMA araştırılmıştır.^[2,8-10] Sarkolektin, kalsisiklin, ısı şok proteinleri, fas/APO1 protein gibi moleküler



Şekil 1. Ki-67 nükleer boyanma gösteren hücreler (Ki-67 x 400).

düzeyde oluşan değişimler ve bunların etkileri kolesteatomda araştırılmıştır.^[11-13]

Dokudaki atipik hücre miktarı ve bu hücrelerin dağılım şeklinin (homojen-heterojen), kalsisiklin oranının tekrarlayan kolesteatomu, normal kolesteatomdan ayırmada kullanılabileceği bildirilmiştir.^[11] Kalsisiklinin hücre siklus kontrolünde önemli yeri vardır. G₁ fazında sentezlenir.^[11] Bir çalışmada kalsisiklinin arttığı durumlarda apoptozun ve proliferasyonun azaldığı saptanmıştır.^[12] Tekrarlayan olgularda kalsisiklin düzeyinde azalma, apoptotik hücre sayısında artış ve bu hücrelerin homojen dağılımı izlenmiştir.

Makrofaj migrasyon inhibe edici faktör (MIF) proenflamatuvar ajan olup, enflamasyon sahasında makrofajların antimikrobiyal aktivitelerini çoğaltarak bakteriyel ve viral enfeksiyonların enflamasyon sahasında tutulmasını sağlar. Makrofaj migrasyon inhibe edici faktör tekrarlayan kolesteatomda anlamlı derecede daha yüksek oranda saptanmıştır.^[14]

Monoklonal antikor olan Ki-67, çoğalan hücrelerde görülen bir çekirdek proteinidir. Esas olarak G₁, S, M ve G₂ fazında nükleer antijen ekspresyonu ile büyüme gösteren hücre fraksiyonunu gösterir. Bununla beraber G₀ fazında yoktur. İnterfaz sırasında antijen çekirdek içinde saptanır, mitoz safhasında iken proteinin çoğu kromozomların yüzeyinde taşınır.^[4] Ki-67 antikorunu çoğalan hücrelerin saptanmasında kullanılan bir belirteçdir. Hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi şekilde gösteren bir protein olup, mitotik indeks ve tümör derecelendirmesinde sıklıkla kullanılır. Ki-67 ekspresyonu proliferatif aktiviteyi ölçen iyi bir göstergedir. Çeşitli çalışmalarda Ki-67 ekspresyonu ile proliferasyon indeksi kullanılarak başka aktivitelerdeki proliferasyonla karşılaştırılmıştır.^[15,16] Ki-67'nin hücre proliferasyonunda RNA-bağlantılı bir rolü olduğu belirtilmiştir.^[17] Büyümekte olan hücrelerin sadece küçük bir kısmı mitozda ya da S fazında olduğundan, S fazındaki hücrelerin bulunması araştırılan doku örneğinin büyüme aktivitesine karşılık gelir. Bu antikor, normal ve neoplastik hücrelerdeki büyüme oranlarının hızlı ve kolay yolla değerlendirilmesini sağlar.^[18]

Choufani ve ark.^[11] tarafından proliferasyon belirteci olarak bakılan Ki-67 düzeyi açısından normal ve tekrarlayan kolesteatomlu olgular arasında farklılık saptanmamıştır. Çalışmamızda da benzer sonuç elde edilmiş, Ki-67 indeks oranları açısından iki ko-

lesteatom grubu arasında anlamlı fark saptanmamıştır.

Uygulanan cerrahi teknikler kolesteatomda nüks gözlenmesi açısından daha önemli yer tutmaktadır. Kapalı tekniklerde nüks oranı açık tekniklere göre daha yüksek oranda izlenmektedir.^[19]

Sonuç olarak, kolesteatomun proliferasyon indeksini ölçmede kullanılan Ki-67 antikorları, kolesteatomun agresifliğini saptamada iyi bir yöntem olabilir. Ki-67 immün boyama kolesteatomun hücre kinetiklerini değerlendirmede yararlı bir araçtır.

KAYNAKLAR

1. Sudhoff H, Hildmann H, Michaels L. Cholesteatoma: pathogenesis. In: Ars B, editor. Pathogenesis in cholesteatoma. New York: Kugler Publications; 1999. p. 79-104.
2. Huisman MA, De Heer E, Grote JJ. Cholesteatoma epithelium is characterized by increased expression of Ki-67, p53 and p21, with minimal apoptosis. Acta Otolaryngol 2003;123:377-82.
3. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 1983;31:13-20.
4. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol 2000;182:311-22.
5. Bujia J, Holly A, Antoli-Candela F, Tapia MG, Kastenbauer E. Immunobiological peculiarities of cholesteatoma in children: quantification of epithelial proliferation by MIB1. Laryngoscope 1996;106:865-8.
6. Albino AP, Kimmelman CP, Parisier SC. Cholesteatoma: a molecular and cellular puzzle. Am J Otol 1998;19:7-19.
7. Bernal Sprekelsen M, Ebmeyer J, Buchbinder A, Sudhoff H. Comparative analysis of the proliferative capacity of cholesteatomas. Acta Otorrinolaringol Esp 2000;51:299-307. [Abstract]
8. Lavezzi A, Mantovani M, Cazzulo A, Turconi P, Matturri L. Significance of trisomy 7 related to PCNA index in cholesteatoma. Am J Otolaryngol 1998;19:109-12.
9. Bayazit YA, Karakok M, Ucak R, Kanlikama M. Cyclin-dependent kinase inhibitor, p27 (KIP1), is associated with cholesteatoma. Laryngoscope 2001; 111:1037-41.
10. Ergun S, Zheng X, Carlsoo B. Antigen expression of epithelial markers, collagen IV and Ki67 in middle ear cholesteatoma. An immunohistochemical Study. Acta Otolaryngol 1994;114:295-302.
11. Choufani G, Mahillon V, Decaestecker C, Lequeux T, Danguy A, Salmon I, et al. Determination of the levels of expression of sarcolectin and calyculin and of the percentages of apoptotic but not proliferating cells to enable distinction between recurrent and nonrecurrent cholesteatomas. Laryngoscope 1999;109:1825-31.
12. Shinoda H, Huang CC. Heat shock proteins in middle ear cholesteatoma. Otolaryngol Head Neck Surg 1996; 114:77-83.
13. Park HJ, Park K. Expression of Fas/APO-1 and apop-

- tosis of keratinocytes in human cholesteatoma. *Laryngoscope* 1999;109:613-6.
14. Choufani G, Ghanooni R, Decaestecker C, Delbrouck K, Simon P, Schuring MP, et al. Detection of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human cholesteatomas and functional implications of correlations to recurrence status and to expression of matrix metalloproteinases-3/9, retinoic acid receptor-beta, and anti-apoptotic galectin-3. *Laryngoscope* 2001;111:1656-62.
 15. Mayot D, Bene MC, Perrin C, Faure GC. Restricted expression of Ki-67 in cholesteatoma epithelium. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119:656-8.
 16. Huisman MA, De Heer E, Grote JJ. Cholesteatoma epithelium is characterized by increased expression of Ki-67, p53 and p21, with minimal apoptosis. *Acta Otolaryngol* 2003;123:377-82.
 17. Scott CS, Fey SJ, Larsen PM. Cytoplasmic Ki-67 expression: a reply to Dario Campana, Elaine Coustan-Smith, and George Janossy. *Leukemia* 1989;3:397.
 18. Bujia J, Holly A, Sudhoff H, Antoli-Candela F, Tapia MG, Kastenbauer E. Identification of proliferating keratinocytes in middle ear cholesteatoma using the monoclonal antibody Ki-67. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1996;58:23-6.
 19. Kuczkowski J, Mikaszewski B, Narozny W. Immunohistochemistry and histopathological assessment of the cholesteatoma of the ear. *Otol Neurotol* 2004; 25:416.