

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI**

**PRİMER AKKİZ AURAL KOLESTEATOM DOKUSUNDA
COX-II, LOX-12 VE İ-NOS GEN EKSPRESYONLARININ
DÜZEYİ VE ETYOPATOGENEZDEKİ ROLÜ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. TOLGAHAN ÇATLI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. SUAT ÖZBİLEN**

**ANKARA
2009**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**.KBB Anabilim Dalı Uzmanlık Programı çerçevesinde yürütölmüş olan bu
çalışma aşağıdaki jüri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmistir.**

Tez Savunma Tarihi 24/11/2009

**BAŞKAN
Prof.Dr.Suat Özbilen
Gazi Üniversitesi
KBB Anabilim Dalı**

ÜYE

**Prof.Dr.Erdoğan İnal
Gazi Üniversitesi
KBB Anabilim Dalı**

ÜYE

**Prof.Dr.Sabri Uslu
Gazi Üniversitesi
KBB Anabilim Dalı**

ÜYE

**Prof.Dr.Yıldırım Bayazıt
Gazi Üniversitesi
KBB Anabilim Dalı**

ÜYE

**Prof.Dr.Berrin Günaydın
Gazi Üniversitesi
Anestezi ve Reanimasyon
Anabilimdalı**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime büyük katkıları olan değerli hocalarım Prof. Dr Suat Özbilen'e, Prof. Dr Erdoğan İnal'a, Prof. Dr Nebil Göksu'ya, Prof. Dr Fikret İleri'ye, Prof. Dr Ahmet Köybaşıoğlu'na, Prof. Dr İsmet Bayramoğlu'na, Prof. Dr Yusuf Kemaloğlu'na, Prof. Dr Sabri Uslu'ya, Prof. Dr. Yıldırım Bayazıt'a, Prof. Dr Kemal Uygur'a, Doç. Dr Metin Yılmaz'a, Doç. Dr Alper Ceylan'a ve tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma; tezimin laboratuvar çalışması kısmında büyük katkıları olan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında görevli Araş. Gör. Akın Yılmaz'a, Araş.Gör.Volkan Ergin'e ve bana her türlü desteği sağlayan canım eşim pediatrist **Dr. Gönül Çatlı**'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Kabul ve Onay.....	i
Teşekkür	ii
İçindekiler.....	iii
Tablolar Dizini	v
Şekiller ve Resimler Dizini.....	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KOLESTEATOM.....	3
2.1.1. Tanım	3
2.1.2. Tarihçe	4
2.1.3. Epidemiyoloji	7
2.1.4. Sınıflama.....	8
2.1.4.1. Konjenital Kolestatom	10
2.1.4.2. Akkız Kolestatom	17
2.1.5. Ultrastrüktürel Özellikler.....	20
2.2. İNFLAMASYON	22
2.2.1. Tanım	22
2.2.2. Siklooksijenazlar ve COX-2	23
2.2.3. Araşidonat Lipooksijenazlar ve LOX-12.....	28
2.2.4. NO ve Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentetaz (i-NOS)	30

2.2.5. Real-time Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PCR).....	33
3. GEREÇ ve YÖNTEM	35
4. BULGULAR.....	48
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇ	59
7. KAYNAKLAR.....	60
8. ÖZET	69
9. SUMMARY	71
10. ÖZGEÇMİŞ	73

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Konjenital Kolestomat: Derlacki ve Clemis sınıflaması.....	14
Tablo 2. Konjenital Kolestomat: Nelson sınıflaması	15
Tablo 3. RT-PCR tepkime karışımı.....	39
Tablo 4. RT-PCR tepkime programı	40
Tablo 5. COX-2 Real-time PCR tepkime karışımı	42
Tablo 6. ALOX12 Real-time PCR tepkime karışımı	43
Tablo 7. iNOS Real-time PCR tepkime karışımı	44
Tablo 8. GAPDH Real-time PCR tepkime karışımı	45
Tablo 9: Kolestomat örnekleri ve sağlıklı kontrol dokularında araştırılan genlerin ifadenme seviyesine ilişkin istatistiksel veri.....	52

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Siklooksijenaz ve izomerazlar aracılığı ile prostanooidlerin sentezi.....25
- Şekil 2.** ALOX izoformları tarafından AA'nın dönüştürüldüğü metabolitler28
- Şekil 3.** COX-2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve bunların cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. [Referans dizi; AY462100.1, Homo sapiens cyclooxygenase 2 (COX2) mRNA, complete cds.]40
- Şekil 4.** ALOX12 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve bunların cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. [Referans dizi; NM_000697.1 Homo sapiens arachidonate 12-lipoxygenase (ALOX12), mRNA.].....43
- Şekil 5.** iNOS mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve bunların cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. [Referans dizi; ENST00000379105.1, Nitric oxide synthase, inducible (NOS type II)]44
- Şekil 6.** GAPDH mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve bunların cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. [Referans dizi; M26434.1, gliceraldehite-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene, complete cds.].....45

Şekil 7. Hasta ve kontrol dokularında GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadenmesini gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi.....	49
Şekil 8. Hasta ve kontrol dokularında COX-2 geninin mRNA düzeyinde ifadenmesini gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi.....	49
Şekil 9. Hasta ve kontrol dokularında ALOX12 geninin mRNA düzeyinde ifadenmesini gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi.....	50
Şekil 10. Hasta ve kontrol dokularında iNOS geninin mRNA düzeyinde ifadenmesini gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi.....	50
Şekil 11. Kolestatom ve sağlıklı kontrol dokularındaki COX-2, iNOS ve ALOX12 genlerinin göreceli mRNA ifadenme seviyeleri. Genlerin kontrol dokusundaki ifadenme düzeyi 1 birim kabul edilerek, kolesteatom dokusundaki değişimleri gösterilmiştir.....	51
Resim 1. Real Time PCR tepkimesi için kullanılan LC cihazına ait görüntüler.....	41

1. GİRİŞ

Aural kolesteatom, temporal kemik içinde yerleşmiş, histolojik olarak benign ancak lokal agresif ve destrüktif epidermoid dokudur (1). Kolesteatom dokusu için söylenebilecek en önemli karakteristik özellik, yıkıcı ve invaziv yapısıdır. Kronik orta kulak iltihabı (kronik otitis media-KOM) ile ilişkili hastalıklara baktığımız zaman, ortaya çıkan mortalite ve morbiditeden sorumlu hastalık grubu olarak kolesteatomlu KOM grubunun ilk sırada yer alıyor olması, bu tehlikeli özelliğinin klinik yansımasıdır. Kendine has bu patolojik doku, ilişkili temporal kemik ve orta kulak boşluğunda yer alan kemikçik zincirin ve diğer anatomik yapıların tahribine bağlı olarak morbidite ve nadir olarak da mortalitesini ortaya koymaktadır. Bu oran çeşitli serilerde farklı değerler olarak ortaya çıkmış olsa da Osma ve arkadaşlarının geniş serisine ait çalışma, KOM'a ikincil komplikasyon gelişen hastaların %78'inde kolesteatom mevcudiyetini göstermiştir (2).

Kolesteatom dokusunun makroskopik olarak göze çarpan kitlesel yapısı dışında, gözle görülmeyen fakat tahrip gücünü büyük ölçüde belirleyen çeşitli ultrastrüktürel özellikleri mevcuttur. Son dekatlar boyunca kolesteatom dokusu ile ilişkili araştırma ve yayınlar, dokunun özellikle genetik düzeyde gösterdiği değişimlerin, normal dokudan farklı olarak karşımıza çıkan moleküler davranışlarından sorumlu olduğunu işaret etmektedir (3, 4).

Bir diğer önemli özellik, kolesteatom mikroçevresinde süregelen kronik inflamasyon ve eşlik eden kronik enfeksiyondur. Yine son yıllarda üzerinde

durulan bir diğerk konu, kulak burun boğaz ile ilişkili kronik hastalıklarda saptanan ve kronik otitis media vakalarında da mevcudiyeti gösterilen biofilm formasyonudur. Özellikle, kolesteatom dokusunda süregelen kronik inflamatuvar reaksiyonun, ortaya çıkan yıkıcı ve lokal invaziv sonuçlarla yakın ilişkide olduğu birçok araştırma ile kanıtlanmıştır (5, 6).

Kolesteatomlu kronik otitis media vakalarında süregelen kronik inflamasyonun ve etkilerinin ciddiyeti göz önüne alındığı zaman, daha uzun yıllar içerisinde bu konunun birçok araştırmaya zemin olacağı aşikardır. Bu noktada biz çalışmamız da, inflamasyon ile ilişkili üç ana inflamasyon geninin “Cyclooxygenase-II (COX-II), Lipoxxygenase-12 (LOX-12) ve inducible- (uyarılabilir) nitric oxide synthase (i-NOS)” kolesteatom matriks dokusundaki ekspresyon oranı ile dış kulak yolu derisindeki ekspresyon oranınınını messenger ribonükleik asit (m-RNA) düzeyinde karşılaştırdık. Amacımız gen ekspresyonlarındaki değişimlerin kolesteatom etyopatogenezi ile ilişkisini ortaya koymaktı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KOLESTEATOM

2.1.1. Tanım

1683 yılında Du Verney tarafından yapılan ilk tanımdan (7) bu yana geçen 336 yıllık süre zarfında pek çok araştırmacı, pek çok yeni tanımlama getirmiş olsa da şuan ki bilgilerimiz bu patolojik doku için seçilen kolesteatom kelimesinin yanlış bir adlandırma olduğunu göstermektedir. Ancak şunu rahatlıkla söyleyebiliriz ki kolesteatom ‘temporal kemik içerisinde yerleşik çok katlı keratinize yassı epitel’ olarak tanımlanabilir. Kolesteatom dokusu en sık orta kulak boşluğu içerisinde karşımıza çıktığı gibi, temporal kemiğin diğer kısımları, petröz apeks, dış kulak yolu ve hatta intradural olarak santral sinir sistemi içerisinde dahi yerleşebilmektedir. Ki, intradural yerleşim mevcudiyetinde lezyon ‘epidermoid’ olarak adlandırılmaktadır.

Kolesteatom dokusu ile ilişkili akılda tutulması gereken en önemli özelliği invaziv ve yıkıcı yapısıdır. Bu özelliği çok katlı yassı epitel dokusu ‘hiperkeratinize’ olduğu andan itibaren kazanmaktadır (8). Bu noktadan sonra patolojik doku yerleştiği alanda ve ilişkili anatomik yapılarda erime ve yıkıma yol açarak tahrip gücü çok yüksek bir doku halini almaktadır.

Histolojik ve biokimyasal analizlerin sonucu göstermiştir ki kolesteatom dokusu kolesterol ve esterlerini ihtiva etmekte ancak yapısında yağ molekülü bulundurmamaktadır (9)(10). Ayrıca ortada benign tümöral oluşumları

adlandırmak için kullanılan –oma ekini hak ettiğini gösteren yeterli sayıda çalışma da bulunmuyor iken, kolesteatom adı yaklaşık 336 yıldır yanlış bir adlandırma olarak kullanılmaktadır.

2.1.2. Tarihçe

Kolesteatom tarihçesine baktığımız zaman karşımıza bu konuda yorum yapan ilk isim olarak Fransız bilim adamı Du Verney çıkmaktadır. 1683 tarihli Fransızca yazılmış olan makalesinde Du Verney kolesteatom kelimesini hiç kullanmamaktadır. Ancak kolesteatomlu kronik otitis media ile ilişkili ‘fistülize mastoidit’ vakasını o kadar net ve eşlik eden semptomları o kadar açık tarif etmektedir ki, bilim çevreleri tarafından Du Verney’in yaptığı bu tanımlama o ana kadar yapılan ilk kolesteatom tanımı olarak kabul görmüştür. Hatta tanımında kolesteatom için patognomonik sayılan ‘fistül ile ilişkili kat kat doku’ varlığı açık seçik kolesteatomda karşımıza çıkan yassı epitel katmanlarını tariflemektedir (7).

Bu tariftten yaklaşık olarak 150 yıl sonra, 1829 yılında Cruveilhier lezyonun ‘subaraknoid bölgede yerleşik hücrelerden köken alan avasküler bir tümör’ olabileceğini belirtmiştir (7). Bu tariftten hemen sonra 1838’de alman bilim adamı Johannes Müller kolesteatom kelimesini ilk kullanan kişi olarak kayıtlara geçmiştir. Ancak bu kayıt hastalığa o tarihten bu yana gelecek bir yanlış isimlendirmede olacaktır. Müller gözlemlerinde kolesteatom dokusu ile ilişkili yassı epitel katmanlarını (squamae) derinin stratum korneum tabakası ile benzeştğini belirtmiş olsada, olası bir epidermal orijinden bahsetmemiştir (7).

1850 yılına gelindiğinde, -her ne kadar orta kulakta epidermal dokunun varlık nedenini açıklayamamış olsa da- kolesteatom dokusu ile malloskum kontagiosumda ve derinin stratum korneum tabakasında olduğu gibi squmöz yapının benzerliğini Joseph Toynbee vurgulamıştır (7). Takip eden 50 yıl boyunca çalışma ve yorumlar epidermal dokunun nasıl olupta orta kulak gibi olmaması gereken bir anatomik lokalizasyonda olduğunu açıklamayı amaçlamıştır.

1855 yılına gelindiğinde Virchow kolesteatomu yassı hücreli kanserler ve ateromlar arasında sınıflamıştır. Ona göre temporal kemik içerisinde yer alan kemik iliği hücreleri önce dedifferansiye olmakta, daha sonra redifferansiye olarak epidermal hücre halini almakta ve böylece heteroplastik bir tümör temporal kemik içerisinde gelişim göstermektedir (7). Bu düşünce mezanşimal hücrelerin metaplazi ile kolesteatoma neden olabileceğini öne süren ilk teoridir. Bu tarihten sonraki süreçte kolesteatom gelişimine yönelik çeşitli teoriler belli miktarlarda taraftar edinerek ortaya atılmaya başlandı. Örneğin Adam Politzer kolesteatoma, orta kulak mukozasında yerleşik glandüler yapıların tümöral gelişimi neden olmaktadır şeklinde bir hipotez öne sürmüştü ancak kısa sürede destek bulamamasının da etkisi ile bu düşüncesinden vazgeçmiştir (7).

Takip eden yıllarda üç ana teori ortaya atılmıştır. Bunlardan ilki Gruber tarafından tanımlanan, perfore timpanik membran üzerinden kronik inflamasyonun da etkisi ile orta kulak mukozasında gelişen metaplazik değişim ve sonuçta orta kulak boşluğunda yassı epitel oluşumudur (7). Bu teori 19. yüzyıl ikinci yarısında pek çok destekçi bulmuş ve hatta Politzer metaplazi teorisinin sıkı bir savunucusu olacak şekilde glandüler neoplazi düşüncesinden vazgeçmiştir.

İkincisi Von Troeltsch tarafından ortaya atılan epitelyal debris gelişim teorisidir. Dış kulak yolu boyunca desquame olan yassı epitelin birikmesi ve dış kulak yolu kemiğini eritebilen litik bir kitle oluşumu üzerine kurulu bir teori olarak kabul edilmiştir (7).

Bezold ve Habermann üçüncü bir teori daha ortaya atmış ve kolesteatomun dış kulak yolunu döşeyen yassı epitelin orta kulağa migrasyonu neticesinde gelişebileceğini belirtmişlerdir (7). Bu teori pek çok bilimsel çevre tarafından olumlu tepkiler almış, pratik olarak pek çok hasta grubunda uygulanabilirliği olduğu içinde uzun bir süre yoğun destek bulmuştur. Ancak 19. yüzyıl ikinci yarısında öykü ve muayene bulgularının neticesinde belli bir hasta grubu için ‘konjenital kolesteatom’ (KK) tanımı ortaya atılınca bu teori bir miktar geçerliliğini kaybetmiştir. Konjenital kolesteatom ile ilgili ana hatları belirleyen kişi 1899 yılında yayınladığı konjenital kolesteatom kriterleri ile Körner olmuştur (7). Ona göre üç ana kriter gerekliydi. Birincisi erken dönemde, çocukluk çağında ortaya çıkması, ikincisi tanıya kadarki süre zarfında herhangi akıntı hikayesinin olmaması ve son olarakta muayenede intakt kulak zarı mevcudiyeti idi. Bu hasta grubunun varlığı Bezold ve Habermann’ın migrasyon teorisi üzerinde olumsuz bir etki bırakmış, pek çok destekçinin kaybı ile sonuçlanmıştır.

Kolesteatomun ilk tanımının yapıldığı 1683 yılından sonraki 250 yıllık süreç bu şekilde özetlenebilir. Ancak şunuda belirtmek gerekir ki günümüze kadar ki yani 20. yüzyıl içerisinde oluşan bilgi birikimi ona kadar ki yorumların hepsini çeşitli derecelerde desteklemekte ve kolesteatomun pek çok boyutta araştırılması gereken yönleri olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle son yüzyıl içerisinde

şekillenen kolesteatom gelişim teorilerini ileriki bölümlerde daha detaylı tartışacağız.

2.1.3. Epidemiyoloji

Kolesteatom ile ilgili prevalans ve insidans çalışmaları pek çok farklı sonuçlar olduğunu belirtse de, en çok kabul gören kolesteatom insidans değeri bir yılda çocuklar için 3/100.000, erişkinler için 9,2 / 100.000 dir. Bu değerler Finlandiya ve Danimarka için saptanan insidans değerleridir. Yine aynı çalışma yıllık insidans için belirgin bir erkek predominansı ortaya koymaktadır. (Yaklaşık 1,4 kat erkeklerde insidans daha fazladır) (11). Konjenital kolesteatom vakaları için saptanan ortalama yaş 5.6 ± 2.8 iken çocuklarda saptanan akkiz kolesteatom vakaları için ortalama yaş 9.7 ± 3.3 dür (12). Çoğu hastalık için belirlenen ırksal farklılıkların kolesteatom içinde geçerli olduğunu söyleyebiliriz. En sık beyaz ırkta (kokasian) görülürken, daha nadir olarak Afrika yerlileri ve çok daha az olarak Asyalılarda görülmektedir. Kemppainen ve arkadaşlarına göre farklı sosyal gruplar için aynı sıklık göze çarpmaktadır (11). Ancak şunu da belirtmek gerekirken Eskimolar için prevalans çok çok düşük değerlerde saptanmıştır. Bunun için getirilen en mantıklı açıklama, ırka özgü geniş nazofarengeal yapı ve buna bağlı olarak da artmış orta kulak havalanmasıdır. Bu özellik Eskimoları kronik orta kulak hastalıklarından ve uzun dönem sekellerinden koruyor gibi görünmektedir (13).

2.1.4. Sınıflama

Kolesteatom üzerine yapılan çalışmaların sayısının ve bilgi birikiminin artışı ile paralel olarak, sınıflamasına yönelik sayısız tartışma ve görüş farklılığı da ortaya çıkmıştır. Klasik olarak kolesteatom üç ana grupta incelenebilir. Birincisi, intakt kulak zarı arkasında gelişen ‘konjenital’ ya da ‘primer’ kolesteatomdur. İkincisi pars flaksidanın sınırlı bir divertikül şeklinde görünmesi ile ilişkili olan ve kulak akıntısının klinik tabloya çok nadir katıldığı ‘primer akkiz’ kolesteatomlardır. Üçüncü grup kolesteatom vakalarında klinik tabloya kulak akıntısı hakim iken, muayene bulgusu olarak orta kulakta granülasyon dokusu ve polip oluşumu eşlik eder. Bu grup kolesteatom vakalarında timpanik zarın posterosüperior kadranında perforasyon mevcuttur ve ‘sekonder akkiz’ kolesteatom olarak isimlendirilirler.

Ancak kolesteatomun klinik davranışındaki ve lokalizasyonundaki çeşitliliğin yansıması olarak, klasik sınıflamanın dışında pek çok araştırmacı, pek çok sınıflama öne sürmüştür. Örneğin Tos, kolesteatomun orijin aldığı bölgeye göre sınıflanabileceğini ve bunun cerrahi prosedür ve prognoz açısından önemli olduğunu belirtmiştir . Bu sınıflamaya göre, pars flaksida da gelişen retraksiyon attik kolesteaoma, pars tensanın posterosüperior kadranında yerleşen retraksiyon ve perforasyonlar sinüs kolesteatomuna, pars tensanın geri kalan kısmından köken alan adezyon ve retraksiyonlar ise tensa kolesteatomuna neden olmaktadır.

1986’da Meyerhoff ve Truelson kolesteatomu, patofizyolojisine, lokalizasyonuna, östaki tüpüne, kemikçik zincir defektine ve komplikasyon varlığı yada yokluğuna göre sınıflayarak dört gruba ayırmıştır (14). Böylece literatüre

primer akkiz, sekonder akkiz, tersiyer akkiz ve konjenital kolesteatom şeklinde yeni bir sınıflama daha eklenmiştir.

Tos ayrıca otoskopik bulgulara göre yaptığı bir başka sınıflama daha önermiştir (15). Bu sınıflamaya göre kolesteatom attik, pars tensa I (marjinal hastalık), pars tensa II (santral hastalık) şeklinde üç gruba ayrılmakta idi. Daha sonra Mills ve arkadaşları Tos'un yapmış olduğu otoskopik sınıflamaya, intakt kulak zarı arkasında yerleşik konjenital kolesteatom grubunda dahil etmişlerdir (16).

1993 yılında Mario Sanna, kolesteatomu temporal kemikte yerleştiği anatomik lokalizasyona göre sınıflayarak beş farklı bölge ile ilişkilendirmiştir (17). Supralabirentin, infralabirentin, masif labirentin, infralabirentin-apikal ve apikal olarak beş anatomik bölge tariflemiştir. Hastalığın yaygınlığını ise etkilenen bölge sayısı ile derecelendirmiştir. Buna göre S1; başladığı anatomik bölgede sınırlı vakaları, S2; ikinci bir anatomik alana uzanan vakaları, S3; üç ayrı anatomik bölgenin tutulduğu vakaları, S4; dört ayrı anatomik bölge tutulan vakaları, S5; başladığı anatomik alana ek olarak dört ya da beş ek bölge uzanımı olan vakaları yansıtmaktadır. Sanna'nın yapmış olduğu bu sınıflama klinik ve pratik olarak çoğu vaka grubuna adapte edilebilmektedir. Ancak petröz apeks yerleşimli lezyonların otoskopik tanı olanağı olmaması dolayısı ile bu grup hastalara uygulanabilirliği yoktur (18).

Kemikçik zincire uygulanan rekonstrüksiyon prosedürlerindeki ilerlemelere bağlı olarak, hastalığın iletim zinciri üzerinde yaptığı tahribatın derecesi ile ilişkili bir sınıflama ihtiyacı doğmuştur. Bu ihtiyacı karşılamak üzere

Wullstein ve Austin, kemikçik zincir hasarını dört grupta incelemişlerdir (19, 20). Buna göre O0; kemik zincirin intakt olduğu hastaları, O1; kemik zincir devamlılığının bozulduğu, inkusun erimiş olduğu vakaları, O2; incus ve stapes suprastrüktürünün eridiği vakaları, O3; malleus ve inkusun olmayıp, stapes suprastrüktürünün erode olduğu vakaları simgelemektedir.

Bir başka sınıflamada kolesteatomun komplikasyon ortaya çıkartıp çıkartmadığını hesaba katmaktadır. Buna göre beş ana komplikasyonun varlığı araştırılmaktadır; Lateral semisirküler kanal fistülü, fasyal paralizi, sensörinöral işitme kaybı, sinüs trombozu ve intrakranial invazyon. C0; komplike olmayan vakaları, C1; bir komplikasyonun geliştiği vakaları, C2; iki ya da daha fazla komplikasyon gelişen vakaları temsil etmektedir (18).

Bahsi geçen çeşitli sınıflamalar yapılmış olsa da, kolesteatom gelişimi ile ilişkili teoretik mekanizmaların temel alındığı iki ana kolesteatom grubu mevcuttur ‘Konjenital ve Akkiz’. Bundan sonraki bölümlerde detaylı olarak bu iki kolesteatom tipinin, ana özelliklerinden ve oluşumu ile ilişkili mekanizmalardan bahsedeceğiz.

2.1.4.1. Konjenital Kolesteatom

Konjenital kolesteatom ile ilgili ilk makalenin 1885 yılında yayınlanmış olmasına rağmen hastalığın gerçek insidansı, etyolojisi ve patogenezi ile ilgili tartışmalar halen devam etmektedir. Konjenital kolesteatom dokusu intradural yada extradural yerleşim gösterebilir. İntradural yerleşim varlığında lezyon ‘epidermoid’ olarak adlandırılmaktadır. İntradural olarak lezyon en sık

serebellopontin köşeden köken alırken ekstradural olarakta orta kulak boşluğu ve mastoid havalı hücrelerde karşımıza çıkmaktadır (21). Derlacki ve Clemis altı vakalık serilerinde konjenital kolesteatom için gerekli tanı kriterlerini ortaya koymuşlardır (22). Buna göre konjenital kolesteatom tanısı için hastanın otoskopik muayenesinde intakt kulak zarı medialinde yerleşik beyaz renkli kitle görünümü olmalı, pars tensa ve pars flaksida da anatomik sorun bulunmamalı, hastanın öyküsünde kulak akıntısı, kulak zarı perforasyonu ve geçirilmiş kulak operasyonu olmamalı. Bu tanımdan sonra Levenson kriterleri revize etmiş ve hastanın daha önce otitis media veya orta kulak effüzyonu geçirmesinin onu tanı dışında tutmaması gerektiğini belirtmiştir (23).

Konjenital kolesteatom vakaları için gerçek bir insidans oranından bahsetmek zor olacaktır. Ancak oranlar son dekatlar boyunca artma eğilimindedir ve bu oran son serilerde 0,12/100.000 olarak bildirilmiştir (24). Son yıllarda otitis media ve allerjinin etkin tedavisi akkiz kolesteatom vakalarının azalmasına ve göreceli olarak konjenital kolesteatom vakalarında artışa sebep olmaktadır. Tabii ki bu artışa katkıda bulunan bir diğer önemli faktör pediatristlerin ve kulak burun boğaz doktorlarının bu konuda bilinçli olması, detaylı otoskopik muayene uygulamasıdır. Ayrıca erken dönemde yapılan işitsel testler, iletim tipi kaybı saptanan hasta grubuna otoskopik incelemenin daha ayrıntılı yapılarak atlanabilen vakalarında tanı almasını sağlamaktadır.

Bilindiği üzere orta kulakta yerleşik herhangi bir kitlesel lezyon, boyutu, lokalizasyonu ve histolojisi ile ilişkili olarak çeşitli semptom ve bulgulara sebep olur. Konjenital kolesteatom vakalarında da erken tanı ile lezyonun nispeten

küçük boyutlarda saptanması hem sekelleri hemde tedavi için uygulanacak prosedürleri en aza indirecektir. KK genellikle kendini rutin otolojik muayene sırasında saptanan asemptomatik, intakt kulak zarı medialine (çoğunlukla ön-üst kadrana) yerleşmiş beyaz renkli kitle olarak gösterir. Genel tanı yaşı ortalama 4 ve 5 yaş arası olarak bilinmektedir.

Otoskopik muayene en sık yerleşim yeri ön-üst kadrandır. Bu lokalizasyonu arka-üst kadrana takip eder. Tanı yaşının ilerlemesi ile birlikte arka mezotimpanik bölge yerleşimi sıkça saptanır. Büyüme genellikle posteriora doğru olmaktadır. Koltai'nin tanımladığı gibi ilerleme yönü doğal yolu izlemektedir (25). İlerleme genellikle arkada kemik zincirin medial yüzeyinden arkaya doğru olmaktadır. Bu ilerleyiş inkudostapedial eklemi ve stapes suprastrüktüründe içine almakta ancak genellikle footplate'i etkilememektedir. İlerleyiş sinüs timpani, fasyal reses ve mastoid hücrelere doğru devam etmekte ancak medialde ottik kapsül ve labirent tutulumu çok nadir olarak karşımıza çıkmaktadır. Büyüme devam ettikçe özellikle arka kadrana yerleşiminin olduğu vakalarda daha sık olacak şekilde iletim tipi işitme kaybı görülmektedir. Bu çoğunlukla kemikçik zincir bütünlüğünün bozulması ile ilişkili olmaktadır. Ön kadrana tutulduğu vakalarda üstaki tüpü disfonksiyonu ile ilişkili olarak gelişen effüzyona bağlı iletim tipi işitme azlığı görülebilmektedir. Kulak ağrısı ya da kulak akıntısı nadir olsada %50 gibi bir oranla bazı hasta gruplarında tekrarlayan otitis media atağı görülmektedir. Eğer kolesteatom dokusu medialde ottik kapsül ve labirent tutulumuna yol açmış ise vertigo ve sensörinöral işitme kaybıda gelişebilmektedir. Geçmiş dönemlerde fasiyal paralizi ile başvuran konjenital kolesteatom vakaları olsada biliyoruz ki

orta kulak yerleşimli konjenital kolesteatom vakalarında fasiyal sinir ile ilişkili sorunlar nadir olarak karşımıza çıkmaktadır. Böyle bir durumda klinisyen ayırıcı tanıda malignite başta olmak üzere, metastazlar, fasiyal sinir nöromaları ve diğer tanıları akılda bulundurmalıdır.

Konjenital form ile akkiz form arasında histolojik fark yoktur. İkisinde de saptanan histolojik görünüm çok katlı yassı epitelin döşediği ortası keratin debris ile dolu kistik lezyondur. Ancak iki form için ayrımı klinik görünüm belirlemektedir.

İletim tipi işitme kaybı saptanan ve muayede intakt kulak zarı bulunan pediatrik yaş grubu hastalara bundan sonra uygulanacak işlem görüntüleme metodlarıdır. Bunun için konvansiyonel röntgen filmleri yeterli bilgi sağlamamaktadır. Seçilecek ilk metod bilgisayarlı tomografidir. Bilgisayarlı tomografinin en önemli üstünlüğü kemik yapı hakkında detaylı bilgi sağlamasıdır. Konjenital kolesteatom dokusunun orta kulakta yerleşim yeri net olarak görülmekte ayrıca boyutu hakkında da bilgi sağlamaktadır. KK dokusu tomografide genellikle hipodens, oval ile yuvarlak arası iyi sınırlı ve kontrast tutmayan ekspansil bir lezyon olarak görülür. Lezyonun kontrast tutmuyor olması onu schwannomlar, glomus tümörleri, sarkomlar veya menejiomlar gibi kontrast tutan lezyonlardan ayırır. Magnetik rezonans görüntüleme (MRG) ile de, orta kulakta yerleşebilen adenomlar, nöromalar, schwannomalar veya metastatik lezyonlardan ayrımı yapılabilmektedir. Genellikle gadolinyum tutulumu gözlenmez. T1 ağırlıklı kesitlerde izointens olabilsede, genellikle beyin dokusuna göre daha hipointens homojen bir lezyon saptanmaktadır. T2 ağırlıklı kesitlerde

ise sinyal intensitesi genellikle beyin omurilik sıvısı (BOS) ile benzer şekilde yüksektir.

KK yassı epitelin lokalizasyonu ve çevre yapılarla ilişkisine göre evrelenebilmektedir. KK ile ilgili ilk evreleme sistemi Derlacki ve Clemis tarafından yapılmıştır (26). Buna göre lezyon ‘petröz piramit, mastoid ve timpanik’ olmak üzere 3 ana grupta evrelenmekteydi. Daha sonra iki ayrı araştırmacı iki farklı evreleme yöntemi daha sunmuştur. Bunlardan ilki Potsic tarafından tariflenmiştir (27). Ona göre 4 evre vardı ve evreler için asıl belirleyici faktör lezyonun kemikçik sistemi ve mastoid ile olan ilişkisiydi (Tablo 1).

Tablo 1. Konjenital Kolestatom: Potsic sınıflaması

Evre 1	Lezyon tek kadranda, kemikçik zincir ya da mastoid tutulumu yok
Evre 2	Lezyon birçok kadranda, kemikçik zincir ya da mastoid tutulumu yok
Evre 3	Kemik zincir tutulumu var ancak mastoid tutulumu yok
Evre 4	Mastoid yayılım mevcut

Potsic ve arkadaşlarına göre vakaların %40 kadarı evre 1, %14 kadarı evre 2, %23 kadarı evre 3 ve %23 kadarı ise evre 4’deydi. Ayrıca onlara göre evre ile rezidüel hastalık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki mevcuttur. Yine Nelson ve arkadaşlarının yapmış olduğu evreleme sistemine göre 3 kategori mevcuttu (12). Tip 1 konjenital kolesteatom vakalarında lezyon mesotimpanumda yerleşmekte ancak inkus yada stapes erozyonu yok. Tip 2 için lezyon mesotimpanum ya da attikte ve kemikçik zincirde erozyon var ancak mastoid

tutulumu yok. Tip 3 hasta grubunda ise lezyon mesotimpanumda ancak mastoid tutulum var (Tablo 2).

Tablo 2. Konjenital Kolesteatom: Nelson sınıflaması

Tip-1	Mesotimpanumda sınırlı, inkus yada stapes erozyonu yok
Tip-2	Mesotimpanik yada attik ve kemikçik zincir erozyonu var ama mastoid tutulum yok
Tip-3	Mesotimpanik ve mastoid tutulum var

Nelson ve arkadaşlarına göre hastaların %15 kadarı tip 1 hasta grubuna, %59 kadarı tip 2 hasta grubuna ve %26 kadarı da tip 3 hasta grubuna dahildi. Ayrıca rekürrens ile evre arasında Potsic ve arkadaşlarının çalışmasında belirtildiği gibi anlamlı bir korelasyon vardı.

Evrelemede ki amaç 4 nedene indirgenebilir. Birincisi operasyon öncesi klinisyene tedavi planında yardımcı olmak. İkincisi prognoz hakkında bilgi vermek. Üçüncüsü klinisyenler arası bilgi aktarımını kolaylaştırmak ve son olarakta tedavi sonuçlarını değerlendirmemize yardımcı olmak. Potsic ve Nelson'nun evreleme sistemleri bu amaçlara hizmet ediyor gibi görünmektedir.

KK için öne sürülen patofizyolojik mekanizmalar 4 ana başlık altında incelenebilir. Bunlar 'Epitelyal Kalıntı Teorisi', 'Metaplazi Teorisi', 'İmplantasyon Teorisi' ve 'İnvajinasyon Teorisi'dir.

a) *Epitelyal Kalıntı Teorisi*: Bu teori aslında KK vakalarının gelişimi için en çok kabul edilen teori olma özelliğine sahiptir. Bu teorinin temeli Teed'in 5 aylık fetal temporal kemikte göstermiş olduğu epidermal yapılara dayanır (28). Daha sonra Michaels'in de katkıları ile teori şekillenmiş ve artık bu iki

araştırmacının adları ile anılır olmuştur (29). Normal bir fetal gelişim sürecinde, insan temporal kemik ve timpanik kavite içerisinde fetal gelişim ile paralel olarak regrese olması beklenen epitelyal odaklar persiste olmakta ve intakt kulak zarı arkasında gelişimini sürdürerek klinik bulgu oluşturuncaya kadar olgunlaşmaktadır. Bu epitelyal doku neden belli bir gestasyonel döneme kadar varlığını sürdürmektedir sorusuna Levensonun yorumu şöyle olmuştur. Ona göre bu epitelyal kalıntılar orta kulak ve timpanik zarın gelişimine yardımcı olmaktadır. Ancak regresyonda gelişen aksama ile sebat etmekte ve ileri ki yaşam döneminde semptomatik olabilen kitlesel lezyonlar halini alabilmektedir (30).

b) *Metaplazi Teorisi*: Bu teoriye göre orta kulak mukozası sürekli bir inflamatuvar uyarıya cevap olarak keratin üretebilen yassı epitelyume metaplazik değişim göstermektedir. Daha öncede Sade tarafından bu metaplazik değişim gösterilmiştir (31), ancak KK vakalarına uygulanabilirliği diğer teorilere göre daha zayıf kalmaktadır.

c) *İmplantasyon Teorisi*: İlk olarak Friedberg ve Sheehy tarafından öne sürülen bu teoriye göre travma yada saptananmayan ve kısa sürede tamir olan kulak zarı perforasyonları neticesinde orta kulak boşluğuna yassı epitel ekilmekteydi.

d) *İnvazinasyon/İnvazyon Teorisi*: İlk olarak Aimi tarafından öne sürülen bu teoride dış kulak yolu epitel dokusu timpanik membrana doğru ilerlemekte ve zarı invaze ederek orta kulak boşluğunda yerini almaktadır. Bu in utero oluşabileceği gibi erken çocukluk döneminde gelişebilmektedir. Ayrıca küçük şiddetli travmalar neticesinde timpanik membranda ortaya çıkan perforasyonlarla

birlikte epitel dokusu orta kulağa girebilmekte ve zar kendini tamir ederken timpanik kaviteye yerleşen yassı epitel keratinizasyona gidebilmektedir.

KK vakalarında uygulanacak cerrahi tedavinin amacı keratinize yassı epitel matriksinde içeren hastalıklı dokunun temporal kemikten tamamen çıkartılmasıdır. Bunun için gerekirse mastoidektominde uygulanabileceği bilinmeli ve işlem sonrası işitme düzeyi optimal seviyede tutulmalıdır. İzole ön üst kadran lezyonlarında standart timpanoplasti yaklaşımı yeterli olabilmekteyken, daha posteriorda ve kemikçik zincir ile ilişkili lezyonlar için mastoidektominde yapıldığı daha geniş bir müdahale gerekebilmektedir. Bu noktada daha çok tercih edilen müdahale intakt kanal mastoidektomi olmaktadır. Çünkü işitme daha iyi korunabilmektedir. Ancak bazı hasta gruplarında ‘canal wall down’ mastoidektomi uygulanması gerekebilmektedir. Örneğin rekonstrüksiyona imkanının olmadığı dış kulak yolu defekti varlığında, labirent fistülü gelişmiş ise, genel durumda kötülük mevcutsa yada hasta uyumu yetersiz ise uygulama ‘canal wall down’ mastoidektomi şeklinde yapılabilmektedir.

2.1.4.2. Akkiz Kolesteatom

Sekonder ya da akkiz olarak adlandırılan bu kolesteatom çeşidi için öne sürülen mekanizmalar son yüzyıl içerisinde pek çok araştırmacının merakını uyandırmış ve çok sayıda araştırmaya konu olmuştur. Aslında dört ana mekanizma ileri sürülmüş ancak son yıllarda her birinin çeşitli derecelerde gelişime katkıda bulunduğu düşüncesi öne çıkmıştır. Bu teoriler metaplazi teorisi, invazyon teorisi, bazal hiperplazi teorisi ve invajinasyon teorisidir.

a) *Metaplazi Teorisi*: Akkiz kolesteatom için öne sürülen yassı epitel metaplazisini ilk olarak 1864 yılında Von Tröltsch öne sürmüştür (32). Ona göre kazeöz ve yoğun iltibabi akıntının yarattığı kronik ıyırı orta kulak mukozasında yassı epitel metaplazisine neden olmaktadır. Yine 1873 yılında Wendt tarafından inflamasyonun orta kulak mukozasını keratinize yassı epitele çevireceği öne sürölmüştür (33). Ayrıca Sade kronik inflamatuvar ıyırı ile ora kulak mukozasında yerleşik pluripotent epitel hücrelerinde yassı epitele metaplazik değişim olacağını öne sürerek bu teoriyi desteklemiştir (34). Bu teoriyi destekleyen bir diğer önemli bulgu kronik sekretuvar otitis media nedeni ile takip edilen çocukların orta kulak mukoza örneklerinde yassı epitele değişimin gösterilmesidir (35). Chole ve Frush tarafından yapılan bir çalışmada, A vitamini azlığının rat orta kulak mukozasında yassı epitel metaplazisine neden olması bu teoriye kısmen destek olmuştur ancak kolesteatoma neden olduğu yönünde bilgi birikimi yeterli değildir (36).

b) *İnvazyon Teorisi*: Bu teori ilk olarak 1888 yılında Habermann ve 1890 yılında da Bezold tarafından öne sürölen bir diğer olası mekanizmadır (37,38). Onlara göre marjinal perforasyon bölgesinden dış kulak yolu yassı epiteli orta kulak boşluğuna doğru migrasyon / invazyon göstermektedir. Bu mekanizma Politzer tarafından desteklenmiştir. Ayrıca Politzer kulak zarında ortaya çıkan perforasyona ikincil infeksiyon ile bu göç tetiklenmektedir şeklinde ek bir katkı ile teoriyi geliştirilmiştir (38). Yine kobaylar üzerinde timpanik membran perforasyonu sonrası yassı epitel göçünün kolesteatoma sebep olacağı Friedmann tarafından gösterilmiştir (39).

c) *Bazal Hiperplazi Teorisi*: Bu teoriye ilişkin ilk gözlemler 1925 yılında Lange tarafından yapılmıştır. Ona göre pars flaksida bölgesinde yer alan keratinize yassı epitel, subepitelyal alana doğru bazal membranı aşmakta ve orta kulakta proliferasyona gidebilmekteydi. Daha sonraları Ruedi ve birçok araştırmacı tarafından desteklenen bu mekanizmada kilit nokta, bazal membranda meydana gelen çözülme ve erimedir. Buna sebep olarakda keratinize yassı epitelde bulunan yalancı ayaksı uzantıların bazal membrana doğru olan hareketidir (40). Bunun neticesinde zar medialine doğru yer değiştiren yassı epitel gelişerek orta kulakta ekspansil kolesteatom dokusunu meydana getirmektedir.

d) *İnvajinasyon (Retraksiyon Poşu) Teorisi*: Bu teori akkiz kolesteatom gelişimi ile ilgili mekanizmalar içerisinde en çok kabul gören mekanizmadır. İlk olarak 1933 yılında Wittmaack tarafından öne sürülmüştür. Bu mekanizmaya göre çoğunlukla pars flaksida daha az olarakta pars tensa orta kulağa doğru retrakte olmaktadır. Buna neden ya orta kulak boşluğunda ki negatif basınç ya inflamasyon ya da her ikisidir. Zarda gelişen cepleşme ile birlikte cep içinde meydana gelen keratin birikimi kolesteatom oluşumuna sebep olmaktadır. Retraksiyon cepleri içerisinde gelişen drenaj bozuklukları Sade'nin gözlemlerine dayanmaktadır (34, 41).

Bu dört temel patogenetik mekanizma dışında gelişim nedeni çok açık olan 2 farklı akkiz kolesteatom mekanizması daha bulunmaktadır. İatrojenik ve Posttravmatik kolesteatomlar.

İatrojenik Kolesteatomlar: Çoğu zaman kolesteatom dışı bir neden dolayısı ile yapılan kulak operasyonları sonrası ortaya çıkar. (timpanoplasti, basınç eşitleyici tüp tatbiki vb.)

Posttravmatik Kolesteatomlar: Yassı epitelin orta kulak boşluğuna saçılması ile sonuçlanan herhangi bir travmatik durum sonrası ortaya çıkar.

2.1.5. Ultrastrüktürel Özellikler

Altta yatan patogenetik mekanizmalar ne olursa olsun, tüm kolesteatomlar neredeyse aynı klinik karakterlere sahiptirler. Bu klinik özelliklerinin başında invazyon, migrasyon, hiperproliferasyon, diferansiyasyon değişiklikleri, agresiflik ve residivizm gelmektedir. Zaten kolesteatom dokusunun ortaya koyduğu morbidite ve mortaliteden bu klinik özellikleri sorumludur. Peki bu özellikler nereden kaynaklanır? Bu sorunun cevabı son dönemde teknolojik gelişmelere paralel olarak ortaya çıkan araştırmalarla verilmeye başlanmıştır. Bu çalışmalar göstermiştir ki kolesteatom dokusu bazı ultrastrüktürel özelliklere sahiptir. Ayrıca şunu da belirtmek gerekir ki kolesteatom dokusu ile ilgili cevaplanması gereken iki temel soru mevcuttur. Birincisi kolesteatomda yer alan yassı epitelin kaynağı neresidir ve dokunun invaziv ve hiperproliferatif davranışı neye bağlıdır? Şu ana kadar ki bilgi birikimi yassı epitelin kulak zarını ve dış kulak yolunu örten epitelden köken aldığını işaret ederken, invaziv ve hiperproliferatif özelliğinin ise büyüme inhibe edici sinyallerin kaybına ve büyümeyi uyarıcı faktörlerin artışına ya da her ikisine birden bağlı olduğunu işaret etmektedir (1).

Normal dış kulak yolu epitelinin kontrol olarak kullanıldığı pek çok çalışma göstermektedir ki kolesteatom dokusuna ait epitelyal hücre kinetikleri değişim göstermektedir. Örneğin bölünen hücreler tarafından ekspresse edilen MIB-1 (Ki-67) düzeyinin kolesteatom dokusunda normal dış kulak yolu epitel hücrelerine göre 2,3 kat daha fazla ekspresyona uğradığı gösterilmiştir (42). Hücresel bölünmede ki bu artış PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ve TM (trombomodulin) düzeylerindeki artışlarla da gösterilmiştir (43). Farklılaşma evresi ve epitel tipine göre değişmekle birlikte sitokeratinler (CK 1-20) epitel hücrelerince üretilen bir çeşit intermediate flaman proteinidir. Çalışmalar göstermiştir ki kolesteatom dokusunda bu proteinin değişen seviyedeki ve çeşitlerdeki ekspresyonları mevcuttur (44). Tüm bu sonuçlar kolesteatom dokusunun hücresel seviyedeki çoğalma ve farklılaşma özelliklerindeki değişimleri işaret etmektedir. Ultrastrüktürel değişimler hücresel proteinler düzeyinde sınırlı kalmamıştır. Kolesteatom dokusuna ait genetik çalışmalar başta P53 olmak üzere hücre çoğalması ve farklılaşmasına ait yollarda kilit rollere sahip genlerde değişen ekspresyon oranlarını işaret etmektedir (45). Ayrıca kolesteatom dokusu ile normal dış kulak yolu derisi veya timpanik membranın karşılaştırıldığı birçok çalışmada göstermiştir ki büyüme faktörleri başta olmak üzere, sitokinler, çeşitli inflamatuvar proteinler, ekstrasellüler matriks makromolekülleri ve çeşitli anjiyogenezis ile ilişkili faktör düzeylerinde de normalden sapmalar mevcuttur (1).

Bu çalışmalar ışığında, hücresel ve moleküler seviyedeki bu değişimlerin kolesteatom dokusunda görülen yıkıcı, invaziv ve hatta mortal sonuçlarla doğrudan ilişkili olduğunu söylemek yanlış olmayacaktır.

2.2. İnflamasyon

2.2.1. Tanım

İnflamasyon; infeksiyon, tahrip etkisi olan maddeler ve yaralanmalar sonrası gelişen doku hasarlarına karşı vücudun gösterdiği spesifik olmayan immün bir cevaptır. İnflamasyon kardinal bulguları olan şişlik, ısı artışı, renk değişikliği, ağrı ve fonksiyonlarda geçici kayıp kriterleri ile tanımlanır (46).

Hasar veren olay vücudu tahrip ettiği andan itibaren, dokudan çevreye ve dolaşım sistemine doğru immün sistem hücrelerinin inflamasyonu yöneten sinyal molekülleri salınmaya başlar. Bu salınım ile beraber vazodilatasyon, vasküler geçirgenlikte artış ve immün sistem hücrelerinin kemotaksis aracılığı ile hasar bölgesinde birikimi meydana gelir (46). Ancak inflamatuvar yanıt hasarın derecesinden bağımsız olarak ortaya çıkar ise vücudu koruması bir yana, yıkım ile sonuçlanabilecek bir dizi reaksiyona sebebiyet vermiş olur. Bunu başta anaflaksi ve bazı otoimmün hastalıkların seyri sırasında görebilmekteyiz. İnflamasyon her ne kadar hasar sonrası lokal bir dizi reaksiyon olarak vücudun doğal bir tepkisi gibi görülsede başta kanser olmak üzere bir çok kronik hastalıkla kuvvetli ilişki içindedir. Bu ilişkinin kolesteatom gelişim sürecinde de çeşitli derecelerde mevcut olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu özellikle kronik inflamasyon zemininde süregelen bir ilişkidir ve kardiyovasküler, pulmoner ve nörolojik hastalıklarda kendini gösterebilmektedir. Örneğin bazı proinflamatuvar gen ürünlerinin apoptozisi baskılamada, proliferasyonda, anjiogeneizde, invazyonda ve

metastazda kritik roller üstlendiği tanımlanmıştır. Bu gen ürünleri arasında interleokin'ler (IL), kemokinler, matriks metallo proteinaz-9 (MMP-9), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), COX-2 ve bazı LOX tipleri sayılabilir (47).

İnflamasyon hasar bölgesinde toplanan hücrelerin tipine göre akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır. İnflamatuvar cevabın katalizleyen enzim gurupları içerisinde siklooksijenazlar (COX), lipooksijenazlar (LOX) ve nitrikoksit sentetazlar (NOS) kilit rol oynamaktadır.

2.2.2. Siklooksijenazlar ve COX-2

Siklooksijenaz enzimleri [COX, Prostaglandin G/H sentaz (PGHS)], bir doymamış yağ asiti olan araşidonik asitten, prostaglandinlerin (PG) biyosentezinde ilk iki basamağı katalizleyen anahtar enzimlerdir (32).

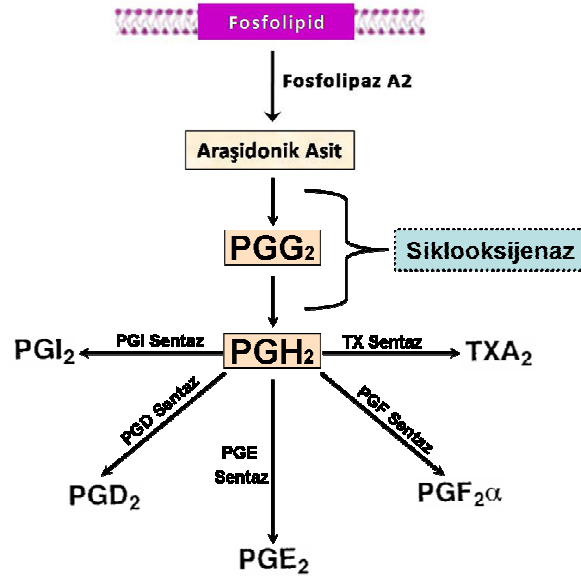
Araşidonik asit (AA, 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid) membran fosfolipidlerinin Fosfolipaz A₂ (PLA₂) enzimi tarafından katalizlenen hidrolizi sonucu oluşur. COX, araşidonik asiti prostanoidlerin (PG, prostasiklin ve tromboksanların genel adı) öncülü olan prostaglandin H₂ (PGH₂)'ye dönüştürür. Bu işlemi sahip olduğu iki aktif bölge aracılığıyla yapmaktadır: Bunlardan ilki araşidonik asitin hidroperoksi endoperoksit PGG₂'ye oksidasyonunu sağlayan siklooksijenaz aktif bölgesidir, diğeri ise PGG₂'nin hidroksi endoperoksit PGH₂'ye indirgenmesini sağlayan ve hem grubu içeren peroksidaz aktif bölgesidir (48).

COX'un, sentezine aracılık ettiği PG'ler lipid tabiatında lokal hormonlardır. Hızla degrade olmaları sebebiyle vücudun diğer bölgelerine

taşınamazlar, otokrin veya parakrin etkilidirler. PG'ler teknik olarak hormon sayılmalarına karşın güçlü fizyolojik etkileri olan aracı moleküllerdir. Etkileri bakımından hormonlara benzetilmelerine rağmen, özgün bezlerden ziyade hemen hemen tüm dokularda oluşmaları ve genellikle lokal olarak etki etmeleri bakımından hormonlardan ayrılırlar (49, 32).

COX katalitik aktivitesinin son ürünü olan PGH_2 , etkinlikleri dokulara göre değişen çeşitli izomerazlar tarafından prostaglandin D_2 (PGD_2), prostaglandin E_2 (PGE_2), prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$), prostasiklin (PGI_2) ya da tromboksan A_2 (TXA_2)'ye dönüştürülür (Şekil 1). Bu son ürünler vücutta ağrı, ateş, inflamasyon, kan pıhtılaşması, ovulasyon, doğumun başlatılması, kemik metabolizması, gastrik mukozanın korunması, yaraların iyileşmesi, sinir gelişimi, immün cevap ve böbrek fonksiyonlarında önemli roller üstlenirler (32).

COX enziminin, COX-1 ve COX-2 adı altında iki izoenzimi tanımlanmıştır. COX'un her iki izoformu benzer yapısal özellik (%60 homoloji) göstermelerine ve aynı reaksiyonu katalizlemelerine karşın substrat, inhibitör ve hücre içi yerleşim bakımından önemli farklılıklara sahiplerdir. Bu nedenle her iki COX formu farklı türde PG'lerin sentezine aracılık eder (48).



Şekil 1. Siklooksijenaz ve izomerazlar aracılığı ile prostanooidlerin sentezi

Bu iki enzim arasında genel bir ayırım yapılacak olursa: COX-1'in fizyolojik, COX-2'nin ise patolojik bir enzim olduğu söylenebilir. COX-2'nin patolojik olarak nitelendirilmesinin temel nedeni: COX-2'yi indüklediği bilinen uyarıların hemen hepsinin inflamasyon ile bağlantılı olmasıdır. Örneğin, bu uyarılar arasında IL-1 α/β , TNF- α , Endotel Hücresi Büyüme Faktörü (ECGF), Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF), Bakteriyel Lipopolisakkarit (LPS), endotoksinler ile onkogenler ve forbol esteri gibi mitojenik uyarılar sayılabilir (50).

Siklooksijenaz-2 (COX-2, PGHS-2)

1991 yılında çeşitli laboratuvarlarda COX aktivitesine sahip ikinci bir gen ürünü, yani COX-2 tanımlanmıştır. COX-2 geni, 1. kromozomun uzun kolu (1q25.2-q25.3) üzerinde yerleşmiştir. Bu gen 8.3 kb uzunluğunda olup, 4.5 kb'lık

bir mRNA'yı kodlamaktadır. COX-2 proteini ise 604 amino asit uzunluğunda ve yaklaşık 72 kDa ağırlığında proteindir (51).

COX-2 geni 10 ekson içermekte olup, sinyal peptid bölgesi, dimerizasyon bölgesi, membran bağlanma bölgesi ve katalitik aktivite bölgesi olmak üzere 4 yapısal bileşene sahiptir (52). Ayrıca 10. ekson, steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçların (NSAID) etkinlikleri için önemli olan özgün amino asit birimlerinin şifrelerini taşır.

Örneğin, aspirin tarafından asetillenerek COX enziminin inhibisyonuna ve dolayısıyla PG sentezinin engellenmesine neden olan serin a.a. birimi (Ser 516) bu ekson tarafından kodlanır (53).

Normal şartlarda genellikle sağlıklı hücrelerde bulunmayan COX-2, akut ve kronik inflamasyon gibi patolojik durumlarda önemli rolleri olan PG'lerin (PGE_2 ve PGF_2) sentezinden sorumludur (32). Bu nedenle günümüzde COX-2'ye özgü anti-inflamatuar ilaçlar geliştirilerek inflamasyonda etkili olan PG'lerin sentezi durdurulmaktadır.

Özellikle inflamasyon, ağrı, ateş, ovülasyon, hamilelik, doğum, böbrek fonksiyonları, kemik metabolizması, doku tamiri, felç, miyokardiyal infarktüs, diyabet, Alzheimer gibi süreçlerde ve kolorektal, prostat, pankreas, deri, özofagus, meme, akciğer gibi bazı kanser türlerinde COX-2'nin fazla ifadeleniği gözlenmektedir (54).

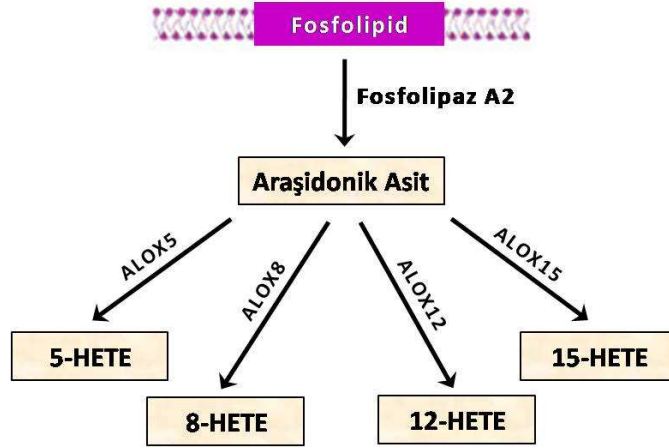
COX-2, çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri veya mitojenler tarafından uyarılarak inflamatuvar süreçte görev alan makrofajlarda, monositlerde, sinoviyal hücrelerde, kondrositlerde, fibroblastlarda ve endotel hücrelerinde ifadelenir (54).

Araşidonat Lipoksijenazlar

COX izoformları gibi lipoksijenazlarda (LOX, araşidonat LOX, EC 1.13.11.12) AA üzerinde etki gösterirler. Bu enzim ailesi serbest ya da esterifiye haldeki çoklu doymamış yağ asitlerine genellikle 5. 8. 12. ve 15.C atomlarından bölgeye özgü (regioselektif) olmak üzere oksijen transfer ederler (55).

ALOX aktivitesi, substrat olarak lipid ile atmosferik oksijen varlığına ihtiyaç duyan, bir bimoleküler reaksiyondur. Eğer bunlardan birisi sınırlı olur ise (ciddi hipoksi durumu gibi) enzimin katalitik aktivitesi değişerek farklı reaksiyon ürünleri oluşmaktadır (56). Bu enzimler yağ asiti dioksijenazlar olarak sınıflandırılırsalar da, peroksidaz, oksijenaz, lökotrien sentaz, lipoksin sentaz ve hepoksilin sentaz gibi çok farklı katalitik aktivitelere sahiplerdir (57).

Bitkilerde, hayvanlarda, bazı deniz canlılarında ve mikroorganizmalarda çeşitli ALOX izoformlarının varlığı gösterilmiştir. Memelilerde dört farklı ALOX izoformu bilinmektedir: ALOX5, ALOX8, ALOX12 ve ALOX15. Enzim adlarındaki bu sayılar AA omurgasında oksijen aktarılan C atomunun numarasını belirtmektedir (57). ALOX enzimleri AA'yı biyolojik yönden aktif olan hidroperoksi-eikosatetraenoik asit (HPETE) metabolitlerine dönüştürür ve daha sonra bunların indirgenmesi ile hidroksieikosatetraenoik asit'ler (HETE) oluşmaktadır (58) (Şekil 2). 5-, 12- ve 15-HETE, ALOX izoformları tarafından oluşturulan önemli AA metabolitleridirler (59).



Şekil 2. ALOX izoformları tarafından AA'nın dönüştürüldüğü metabolitler

ALOX5 hariç, insandaki diğer ALOX genleri 17. kromozomun kısa kolu üzerinde birkaç megabazlık bölge içerisinde kümelenmiştir. Bu durum aynı kromozom üzerindeki çoklu ALOX genlerinin duplikasyonlar sonucu oluştuğu düşüncesini kuvvetlendirmektedir, ancak henüz ALOX izoformlarının evrimi tam olarak açıklanabilmiş değildir (57).

ALOX izoformları, inflamasyon, immün yanıt ve tümör oluşum sürecine etkileri açısından COX ve PG'ler kadar ayrıntılı çalışılmamıştır, ancak güncel çalışmalar bazı ALOX ürünü metabolitler ile COX-2 ürünü metabolitlerin inflamasyon üzerinde ortak etkileri olduğunu göstermiştir (60).

2.2.3. Araşidonat 12-Lipoksijenaz (ALOX12, 12-LOX)

ALOX12 enzimi, AA'nın 12 numaralı C atomuna bir moleküler oksijen aktararak 12-hidroperoksieikosatetraenoik asit (12-HPETE) oluşumunu katalizler. Daha sonra 12-HPETE'nin indirgenmesiyle yine aktif bir metabolit olan 12-HETE meydana gelir (61).

ALOX12'nin, ilk defa tanımlandıkları hücre tiplerine göre adlandırılan, üç izoformu mevcuttur: Platelet tipi, lökosit tipi ve epidermis. Lökosit tipi ALOX12 yaygın olarak ifadelenirken, trombosit ve epidermis izoformları sadece birkaç hücre tipinde ifadelenmektedir. Lökosit tipi ALOX12 başlıca mast hücrelerinde, eozinofillerde, monositlerde, dendritik hücrelerde ve bronşial epitel hücrelerde gözlenmektedir (56).

ALOX12 geni 17. kromozomun kısa kolu üzerinde yerleşiktir (17p13.1). Kofaktör olarak demir bulunduran ve doymamış yağ asitlerine oksijen aktaran birkaç ALOX izoformundan bir tanesidir. Hayvanlar aleminde belgelenen ilk ALOX izoformu ALOX12'dir (56).

ALOX12 geni 16100 baz çiftinden oluşmaktadır. 14 ekson içeren bu genin transkript uzunluğu 2335 bazdır. ALOX12 enzimi ise 662 aa.'ten oluşan ve 70 kD'luk moleküler ağırlığa sahip bir proteindir (56).

12-HETE'nin ve diğer AA kökenli metabolitlerin (eikosanoidler) biyosentezi NF- (nükleer faktör) kappa B tarafından COX ve ALOX genlerinin transkripsiyonel düzenlenmesi yapılarak gerçekleşir. Özellikle inflamasyon ve kanser olgularında sıkça karşımıza çıkan transkripsiyon faktörü NF-kappa B, COX-2 ve ALOX12 genlerinin promotöründe bulundurdıkları cis-etkili kappa B elementi sayesinde, promotöre bağlanarak enzimlerin ifadelenmelerini düzenler (58). ALOX12 ile NF-kappa B aktivasyonu arasındaki doğrudan ilişki özellikle bazı kanser hücrelerinde rapor edilmiştir. ALOX12 aracılığıyla oluşturulan 12-HETE metaboliti, invazyonu, metastazı ve anjiogenezisi artırırken, bunun yanında tümör hücrelerini apoptozisten alıkoymaktadır (61).

Lökositler, makrofajlar ve mast hücreleri gibi immün hücrelerin uyarılmasında etkin olan inflamatuvar indükleyiciler endojen ve ekzojen AA'nın kullanılarak bahsi geçen çeşitli metabolitlerin üretimine neden olurlar. Özellikle COX ve ALOX ürünü bu metabolitler çeşitli inflamatuvar ve neoplastik hastalıklarda artış gösterdiğinden, bu enzimlere karşı oluşturulan inhibitör ilaçlar inflamasyonun çözülmesinde ve kanser oluşumunun önlenmesinde yarar sağlamaktadır (62).

2.2.4. Nitrik Oksit

NO, biyoaktif metabolitlerin en küçüklerinden biridir. Yarı ömrü sadece birkaç saniye olup, bu nedenle yakın çevresi üzerinde etkindir. Düşük molekül ağırlığı ve lipofilik yapısı nedeni ile kolay ve hızlı bir şekilde hücre zarlarından geçebilmektedir. Bir veya daha fazla sayıda ortaklanmamış elektron içeren atom ya da moleküllere serbest radikal denilmektedir ve NO taşıdığı ortaklanmamış elektron nedeniyle bir radikalik moleküldür. Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücre için zararlıdır, ancak NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde bulunmaktadır ve bu özellikler NO'yu ideal bir molekül yapmaktadır. Buna karşın aşırı ve kontrolsüz NO üretimi hücreler için zararlı olabilmektedir. Serbest radikaller katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPX) gibi antioksidan sistemler tarafından bir denge içerisinde tutulur. Geçici olmasına rağmen serbest radikallerin antioksidanlara karşın üstünlüğü, yani dengenin oksidan lehine kayması, çeşitli hücre hasarlarına ve kronik hastalıklara yol açabilir (63).

NO fizyolojik ve inflamatuvar süreçte önemli bir aracı molekül olarak kabul edilir. Kan damarlarının gevşemesinde, solunum, gastrointestinal, genitoüriner sistemde NO-bağımlı mekanizmalar kullanılmakta ve merkezi sinir sisteminde bir nörotransmitter olarak hafızanın oluşumunda rol oynamaktadır. NO ayrıca trombositlerin yapışarak birikmesini engeller, kalp kasılmalarında düzenleyicidir ve iyon kanallarının açılıp/kapanmasına katkıda bulunur. Bunlara ek olarak nonspesifik immünitede de rolü vardır. Sitotoksik özelliğe sahip olduğundan, vücut savunması ve immünolojik reaksiyonlar sırasında aktive olmuş makrofajlar tarafından çok miktarda üretilirler (64, 65).

Nitrik Oksit Biyosentezi ve iNOS

NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile L-arjinin'in oksidatif deaminasyonu sonucu oluşan ve sayısız biyolojik sürece dahil olan gaz tabiatında küçük bir radikal moleküldür (66). $L-Arg \rightarrow NO + L-Sitrulin$, biçiminde özetlenebilecek tepkimede NOS katalizasyon için moleküler oksijen ve kofaktör olarak da NADPH'a ihtiyaç duymaktadır. NOS'un birbirine yapısal olarak çok benzeyen 3 izoformu bulunmaktadır (67).

- Nöronal NOS (nNOS – NOS1)
- İndüklenebilir NOS (iNOS – NOS2)
- Endotelial NOS (eNOS – NOS3)

eNOS ve nNOS düşük miktarlarda sürekli olarak ifadelenirler ve kalmodulin varlığında sitoplazmik Ca^{2+} artışına paralel olarak ifadelenmeleri artar. Ca^{2+} 'un hücre içine akışı NO'nun hızla üretilmesine neden olur.

Buna karşın iNOS, çeşitli sitokinler ve diğer uyarılar tarafından makrofajların ve diğer bazı hücre gruplarının aktive edilmesiyle indüklenerek NO sentezine katılır ve bunun için de Ca^{2+} artışına ihtiyaç duymaz (64).

iNOS geni 26 ekson içermektedir. Kromozom 17'nin sentromeri ile uzun kolu arasında (17cen-17q11.2) yerleşik olan iNOS geninin ürünü 1153 a.a. uzunluğunda ve 131 kD ağırlığında bir proteindir (64).

NO'nun etkilerinin çoğuna aracılık eden klasik yolak, çözünebilir guanilat siklaz (sGC) aktivasyonu ve GTP'nin, ikincil haberci molekül, siklik guanozin monofosfatlara (cGMP) dönüşümüdür. NO inflamasyon reaksiyonlarında çok yönlü bir role sahiptir. İnflamatuvar ajanların ve sitokinlerin varlığında iNOS'un ifadenmesi artarak NO miktarı yüksek düzeylere çıkar (65). Sitokinler tarafından aktive edilmiş makrofajların tükettiği L-arjinin'in 1/3'ü NO üretmek için kullanılmaktadır. NO'nun akut ve kronik inflamasyonda etkili olduğu bilinmektedir ve NOS inhibitörleri ile gerçekleştirilen tedavinin ratlarda akut inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Çeşitli dokular inflamatuvar sitokinlere maruz bırakıldığında ise iNOS ifadenmesinde ve dolayısıyla NO miktarında artış gözlenmiştir (65).

Çalışmamızda, bu bilgiler ışığında kolesteatom matriks dokusunda COX-2, LOX12 ve iNOS genlerinin ifadenme seviyeleri, dış kulak yolu derisi ile karşılaştırmalı olarak Real-time polimeraz zincir tepkimesi (PCR) yöntemi aracılığıyla araştırılmak istenmiştir. Dolayısıyla yazımızın bu aşamasında Real-time PCR'dan bahsetmek doğru olacaktır.

2.2.5. Real-Time Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR)

1988 yılında “*Thermus Aquaticus*” bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanıklı polimerazın (taq polimeraz) kullanımı ile DNA zincirinin istenilen bir bölgesini çoğaltmak, moleküler genetik alanında devrim niteliği taşıyan bir buluştur. Son yıllarda PCR’da sıcaklık döngülerini sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler – ısı döngü cihazı) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, Real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Real-time PCR teknolojisi ilk defa Higuchi ve arkadaşları tarafından 1993 yılında geliştirilmiştir (68). Real-time PCR, nükleik asit amplifikasyonunun floresan boyalar kullanılarak eş zamanlı (real-time) olarak izlenildiği bir yöntemdir. Yöntem için özel deteksiyon sistemine sahip bir PCR cihazı gerekmektedir. Gen ifadenmesinin analizini değiştiren bu metod ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. Ekstra görüntülemeye gerek duyulmaması, nitelik ve nicelik yönünden kısa sürede çok sayıda örneği analiz edebilmesi, sonuçların kantitatif olarak verilmesi, dizilemeye gerek kalmadan tek nükleotid farklılıklarının saptanabilmesi, genotiplendirme yapılabilmesi, tüpte uygulandığı için kontaminasyon riskini en aza indirmesi yöntemin avantajları arasındadır. Ayrıca ürün analizi için agaroz jel elektroforezi ve DNA veya RNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi basamakları ortadan kaldırmaktadır (69).

Bu özellikleri göz önüne alındığında, Real-time PCR; gen ifadenmesinin ölçümü, genotiplendirme, kromozomlardaki sayısal ve yapısal bozuklukların (mutasyon) analizi, infeksiyon hastalıklarının tanısı, DNA hasarının belirlenmesi

(mikrosatellit instabilitesi), epigenetik araştırmalar (metilasyon belirlenmesi) gibi giderek artan kullanım alanları ile mikrobiyoloji ve moleküler genetik laboratuvarlarında yaygın olarak tercih edilmektedir (69). Bu sistemin geliştirilmesinde çeşitli kimyasallar kullanılmıştır. Bunların arasında DNA çift zincirine bağlanan, diziye özėün olmayan floresan boyalar (Etidyum bromür, SYBR Green I) ve diziye özėün çeşitli floresan işaretli problar (TaqMan prob, Hibridizasyon probları, moleküler beacon'lar, scorpion primerleri, Light-up prob, Sunrise prob) bulunur (36).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araç ve Gereçler

Kullanılan Laboratuvar Cihazları ve Gereçler

- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Spin vorteks (Biosan, Rusya)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan, Rusya)
- Manyetik karıştırıcı (TMA 2071, Almanya)
- Santrifüj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000, ABD)
- pH metre (WTW 422, Almanya)
- Mikropipetler (10 µL, 100 µL, 100 µL) (CLP, ABD)
- Derin dondurucu (-86°C) (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu (-30°C) (Sanyo, Japonya)
- Güvenlik kabini (VFRS 1206 E, Danimarka)
- Azot tankı (GT212 EINOX Air liquide, Fransa)
- Thermal Cyclers (Hybaid PCR-sprint, Thermo electron corp., ABD)
- LightCycler Real-time PCR cihazı (Roche, Almanya)
- Filtreli mikropipet uçları (CLP, ABD)
- Steril enjektör (2ml) (Ayset, Türkiye)
- Steril enjektör (5ml) (Medplast-S, Türkiye)
- Steril enjektör (10ml) (Hayat, Türkiye)

- 0.2-0.5-1.5 µl'lik ependorf tüpler (CLP, ABD)

Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Tris-HCL (Sigma, ABD)
- KCl (Sigma, ABD)
- MgCl₂ (Fermantas, ABD)
- EDTA (Etilendiamintetraasetikasit disodyum dihidrat) (Sigma, ABD)
- Serum fizyolojik (Eczacıbaşı, Türkiye)
- Steril dH₂O (Eczacıbaşı, Türkiye)
- DEPC'li (Dietilpirokarbonat) su (Biological Industries, İsrail)
- Kloroform (Amresco, ABD)
- İzopropanol (Amresco, ABD)
- Saf etanol (Carlo Erba, İtalya)
- DNaz I recombinant (Roche, Almanya)
- LC FastStart DNA SYBR Green I karışımı (Roche, Almanya)
- Bölgeye özgü primerler (COX-2, ALOX12, iNOS, ve GADPH) (Tibmolbiol, Almanya)

Kullanılan Kitler

- peqGOLD TriFast™ Dokudan RNA İzolasyon kiti (Peqlab, Erlangen, Almanya)
- Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti (Roche, Almanya)

Yöntemler

Çalışma Grubu ve Klinik Özellikler

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenen 01/2007-28 kodlu bu çalışma üniversitemiz yerel etik kurulu tarafından onaylandı. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran kolesteatom'lu kronik otitis media tanısı almış, yaşları 10 ila 57 arasında değişen 3 bayan ve 7 erkek hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

Kolesteatom Matriks Dokusundan Total RNA Saflaştırılması

Hastalardan mastoidektomi operasyonu esnasında alınan kolesteatom matriksi steril bir şekilde RNA izolasyonuna uygun (50mg-100mg) büyüklüklerde steril bistüri ile küçük parçalara ayrıldı. DNaz ve RNaz içermeyen 1.5 ml'lik ependorf tüplerine alınan doku örnekleri hızlı bir şekilde sıvı azot içerisinde donduruldu. Örnekler analiz gününe kadar -80°C' de saklandı.

Doku örneklerinden RNA izolasyonu işlemi, peqGOLD TriFast™ dokudan RNA izolasyon kiti kullanılarak, aşağıda yazılı olan protokole göre yapıldı. Kontaminasyonu engellemek amacı ile işlemler güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi.

1. 1.5 ml'lik ependorf tüp içinde bulunan 50-100 mg arasındaki dokular çözünmeden pastle ile homojenize edildi.

2. Homojenat üzerine 1000 mikrolitre (μ l) TriFast eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
3. 200 μ l kloroform eklenerek, 15 sn boyunca karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında tutuldu.
4. Örnekler 11.000 rpm'de 5 dk 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda karışım, altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), ara faz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrıldı.
5. Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 500 μ l izopropanol eklenip karıştırıldı.
6. Örnekler 1.5 saat -20°C'de bekletildi. 11.500 rpm'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı.
7. DNA kontaminasyonunu engellemek için 60 μ l DNaz (μ g başına 5U DNaz), 300 μ l DNaz Buffer I ve 400 μ l DEPC'li su eklenerek 30 dk 37°C sıcaklıkta bekletildi.
8. Örneklerin üzerine 300 μ l 25mM EDTA eklendi ve 65°C'de 10 dk bekletildi.
9. 12.000 rpm'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üst sıvı atıldı.
10. 1000 μ l %75'lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üst sıvı atıldı.
11. Peletin üzerine tekrar 1000 μ l %75'lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üst sıvı atıldı.

12. Pelet kurumaya bırakıldı. 30-50 µl DEPC’li su ile sulandırıldı. Çalışma gününe kadar -80 °C’de saklandı.

cDNA Sentez Tepkimesi

Elde edilen RNA’lar spektrofotometre’de [RNA için 260 nanometre’de (nm); protein için 280 nm] ölçülerek nanogram/mikrolitre (ng/µl) miktarları ve saflıkları belirlendi. Primer olarak random hegzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA’dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. RT-PCR tepkime karışımı

Son Konsantrasyon		Hacim
Steril H ₂ O-PCR Grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4 µl
Dntp	1mM	2 µl
Random Hegzamerler	60 µM	2 µl
RNaz İnhibitörü	20 ünite (U)	0.5 µl
Ters Transkriptaz	10 U	0.5 µl
Total RNA	1 µg	1 µg

RT-PCR Programı

Otomatik ısı döngü cihazı Tablo 4’de belirtilen programa ayarlanarak RNA’lardan cDNA elde edildi.

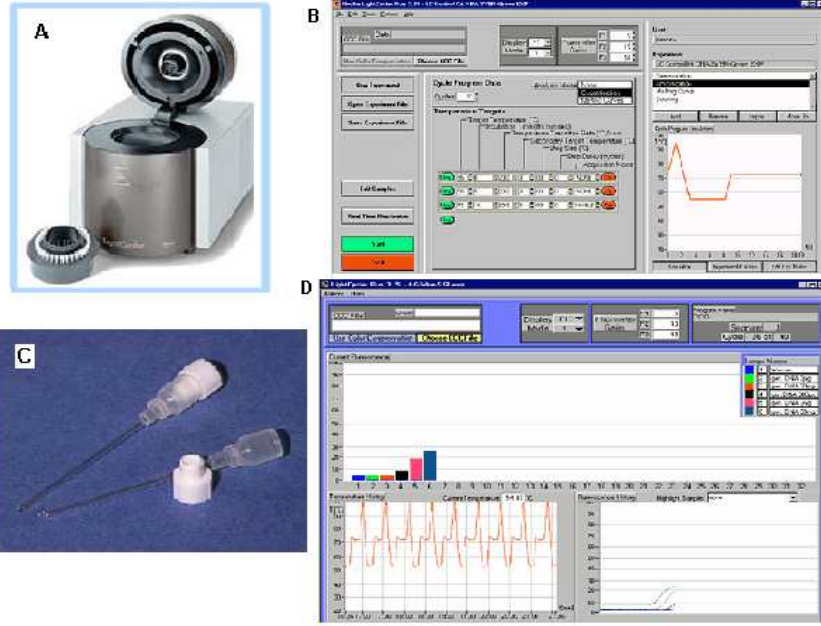
Tablo 4. RT-PCR tepkime programı

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25 °C	10 dk	1 döngü
Ters Transkripsiyon	50 °C	60 dk	1 döngü
İnaktivasyon	85 °C	5 dk	1 döngü
Soğutma	4 °C	-	1 döngü

Reaksiyon sonucu cDNA örnekleri Real-time PCR’da kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

COX-2, ALOX12 ve iNOS Genlerinin İfadelenme Düzeylerinin Real-time PCR ile Değerlendirilmesi

COX-2, ALOX12 ve iNOS genlerinin ifadenmesinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler™ (LC) cihazı kullanıldı (Resim 1). Amplifikasyonlar 10 µl toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA ve uygun primerler eşliğinde LC FastStart DNA SYBR Green I karışımı kullanılarak gerçekleştirildi. COX-2, ALOX12 ve iNOS genlerinin ifadenmesini normalize etmek için elde edilen cDNA örnekleri, GAPDH genine özgü primerler kullanılarak da çalışıldı.



Resim 1. Real Time PCR tepkimesi için kullanılan LC cihazına ait görüntüler

- A: Real Time PCR cihazı
- B: PCR tepkimesi için gerekli sıcaklık, süre ve döngü sayısının bilgisayar ortamında girildiği program sayfası
- C: PCR tepkimesi için hazırlanan karışımın konulduğu, cam malzemeden üretilmiş kapiller
- D: Tepkime sırasında örneklerin durumunu grafik ve logaritmik eğri olarak gösteren program sayfası

COX-2 Geninin İfadeleme Düzeyinin Kantitatif Analizi

Şekil 3’de gösterilen primerler ile LC FastStart DNA SYBR Green I karışımı ve COX-2 mRNA’sından elde edilen cDNA’lar kullanılarak LC cihazında Real-time PCR tepkimesi gerçekleştirildi. Real-time PCR tepkimesi karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler ve oranları Tablo 5’de verilmiştir.

5'-TCACGCATCAGTTTTTCAAGA-3'
5'-TGCCCAGCACTTCACGCATCAGTTTTTCAAGACAGATCATAAGCGAGGGCCAGCTT
TCACCAACGGGCTGGGCCATGGGGTGGACTTAAATCATATTTACGGTGAAACT-3'
3'-CACCTGAATTTAGTATAAATGCCACT-5'

Şekil 3. COX-2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve bunların cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. [Referans dizi; AY462100.1, Homo sapiens cyclooxygenase 2 (COX2) mRNA, complete cds.]

Tablo 5. COX-2 Real-time PCR tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	5.8 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
COX-2 PrimerF (10 pmol/µl)	4 pmol	0.5 µl
COX-2 PrimerR (10 pmol/µl)	4 pmol	0.5 µl
LC FastStart DNA SYBR Gren I karışımı		1 µl
cDNA	-	1 µl

ALOX12 Geninin İfadeleme Düzeyinin Kantitatif Analizi

Şekil 4'de gösterilen primerler ile LC FastStart DNA SYBR Green I karışımı ve ALOX12 mRNA'sından elde edilen cDNA'lar kullanılarak LC cihazında Real-time PCR tepkimesi gerçekleştirildi. Real-time PCR tepkimesi karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler ve oranları Tablo 6'da verilmiştir.

5'-CCAGTATCACTTGCTGAACACG-3'
5'-TCAGATTTCCAACTGCACGAGATCCAGTATCACTTGCTGAACACGCACCTGGTGGC
TGAGGTCATCGCTGTCGCCACCATGCGGTGCCTCCCAGGACTGCACCCCATCTTCAAG
TTCCTGATCCCCCATATCCGCTACACCATGGAAATCAACACCCGGGC-3'
3'-TTCAAGGACTAGGGGGTATAG-5'

Şekil 4. ALOX12 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve bunların cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. [Referans dizi; NM_000697.1 Homo sapiens arachidonate 12-lipoxygenase (ALOX12), mRNA.]

Tablo 6. ALOX12 Real-time PCR tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	5.8 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
ALOX12 PrimerF (10 pmol/µl)	4 pmol	0.5 µl
ALOX12 PrimerR (10 pmol/µl)	4 pmol	0.5 µl
LC FastStart DNA SYBR Green I karışımı	-	1 µl
cDNA	-	1 µl

iNOS Geninin İfadelenme Düzeyinin Kantitatif Analizi

Şekil 5'de gösterilen primerler ile LC FastStart DNA SYBR Green I karışımı ve iNOS mRNA'sından elde edilen cDNA'lar kullanılarak LC cihazında Real-time PCR tepkimesi gerçekleştirildi. Real-time PCR tepkimesi karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler ve oranları Tablo 7'de verilmiştir.

5'-TCCTGGTTTGACTGTCCTTACC-3'

**5'-CAGGTCTCTTCCTGGTTTGACTGTCCTTACCCCGGGGAGGCAGTGCAGCCAGCTGC
AAGCCCCACAGTGAAGAACATCTGAGCTCAAATCCAGATAAGTGACATAAGT-3'**

3'-GTCACTTCTTGTAGACTCGAGTT-5'

Şekil 5. iNOS mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve bunların cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. [Referans dizi; ENST00000379105.1, Nitric oxide synthase, inducible (NOS type II)]

Tablo 7. iNOS Real-time PCR tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	5.8 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
iNOS PrimerF (10 pmol/µl)	4 pmol	0.5 µl
iNOS PrimerR (10 pmol/µl)	4 pmol	0.5 µl
LC FastStart DNA SYBR Green I karışımı	-	1 µl
cDNA	-	1 µl

GAPDH Geninin İfadeleme Düzeyinin Kantitatif Analizi

Şekil 6'da gösterilen primerler ile LC FastStart DNA SYBR Green I karışımı ve GAPDH mRNA'sından elde edilen cDNA'lar kullanılarak LC cihazında Real-time PCR tepkimesi gerçekleştirildi. Real-time PCR tepkimesi karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler ve oranları Tablo 8'de verilmiştir.

5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
5'TCTTTTGCCTCGCCAGCCGAGCCACATCGCTCAGACACCATGGGGAAGGTGAAGGT
CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTATTGGGCGCCTGGTCACCA-3'
3'-CCTAAACCAGCATAACCCG-5'

Şekil 6. GAPDH mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve bunların cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. [Referans dizi; M26434.1, gliceraldehite-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene, complete cds.]

Tablo 8. GAPDH Real-time PCR tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
dH₂O	-	5.8 µl
MgCl₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
HPRT PrimerF (10 pmol/µl)	10 pmol	0.5 µl
HPRT PrimerR (10 pmol/µl)	10 pmol	0.5 µl
LC FastStart DNA SYBR Green I karışımı	-	1 µl
cDNA	-	1 µl

Real-time PCR karışımı hazırlandıktan sonra kapiller tüplere dağıtıldı ve en son üzerine cDNA eklendi. Kapiller tüpler 3000-5000 rpm'de 10 sn santrifüj edildi. Daha sonra LC cihazında aşağıda belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. COX-2, ALOX12, iNOS, ve GAPDH için aynı PCR programı kullanılmıştır.

COX-2, ALOX12, iNOS ve GAPDH Light-Cycler Deney Programı

Program 1 - Ayrılma (Denatürasyon)

Döngü	1
Analiz	-
Hedef Sıcaklık	Kısım 1
Hedef Sıcaklık (°C)	95
İnkübasyon Süresi (s:dk:sn)	10.0
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0

Program 2 – Primer Bağlanması ve Uzama

Döngü	40		
Analiz	Çoğalma		
Hedef Sıcaklık	Kısım 1	Kısım 2	Kısım 3
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60	72
İnkübasyon süresi (s:dk:sn)	10	20	15
Sıcaklık Değişim Hızı (°C/sn)	20.0	20.0	20

Program 3 - Erime Eğrisi Analizi

Döngü	1		
Analiz	Melting analizi		
Hedef Sıcaklık	Kısım 1	Kısım 2	Kısım 3
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60	98
İnkübasyon süresi (s:dk:sn)	0	20	0
Sıcaklık Değişim Hızı (°C/sn)	20.0	20.0	0.2

Program 4 – Soğutma

Döngü	1
Analiz	-
Hedef Sıcaklıklar	Kısım 1
Hedef Sıcaklık (°C)	40
İnkübasyon Süresi (s:dk:sn)	30
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0

Reaksiyon sonucu her bir bireye ait COX-2, ALOX12, iNOS ve GAPDH genlerinin mRNA ifadenme düzeyini gösteren threshold cycle (Ct) değerleri belirlendi. COX-2, ALOX12 ve iNOS genlerinin ifadenme düzeyleri GAPDH geninin ifadenme düzeyi referans alınarak normalize edildi.

4. BULGULAR

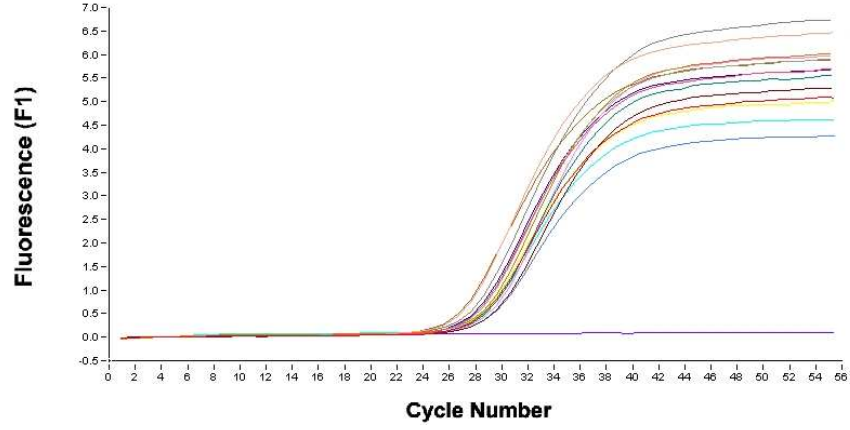
Bu çalışmada kolesteatom matriks dokusunda COX-2, ALOX12 ve iNOS genlerinin ifadenme seviyeleri araştırılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında 10 hastaya ait kolesteatom matriks dokusu ile kontrol amaçlı olarak aynı bireylerin dış kulak yolundan alınan sağlıklı epitel doku kullanılmıştır.

COX-2, ALOX12 ve iNOS genlerinin ifadenmesinin Real-time PCR ile ölçümü için Light Cycler™ cihazı kullanıldı. COX-2, ALOX12 ve iNOS gen ifadenmesini normalize etmek için hasta ve kontrol gruplarına ait her bir cDNA örneği, GAPDH genine özgü primerler ile LC FastStart DNA SYBR Green I karışımı kullanılarak çalışıldı. Relatif gen ifadenmesinin istatistiksel sonuçları REST programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir (70).

$$R = \frac{E(\text{hedef})^{\Delta Ct(\text{kontrol} - \text{hasta})}}{E(\text{referans})^{\Delta Ct(\text{kontrol} - \text{hasta})}}$$

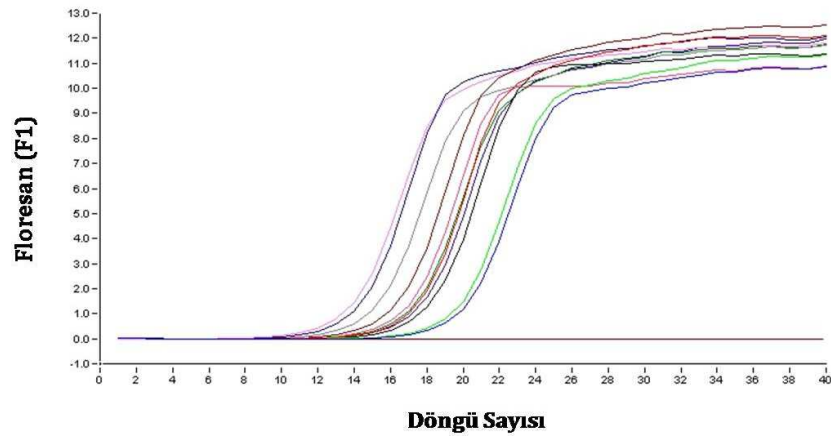
Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini ifade etmektedir. ΔCt değeri kontrol ile hasta örneklerinin Ct değerleri arasındaki farkı gösterirken, R değeri ise ifadenme oranını göstermektedir. Ct, tepkime sırasında oluşan floresans ışımının eşik değerini geçtiği andaki siklus sayısını ifade eder. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır (71). Gen ifadenmesinin Pfaffl matematiksel yöntemi ile hesaplanabilmesi için

gerekli olan referans GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadenmesini gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 7’de gösterilmiştir.



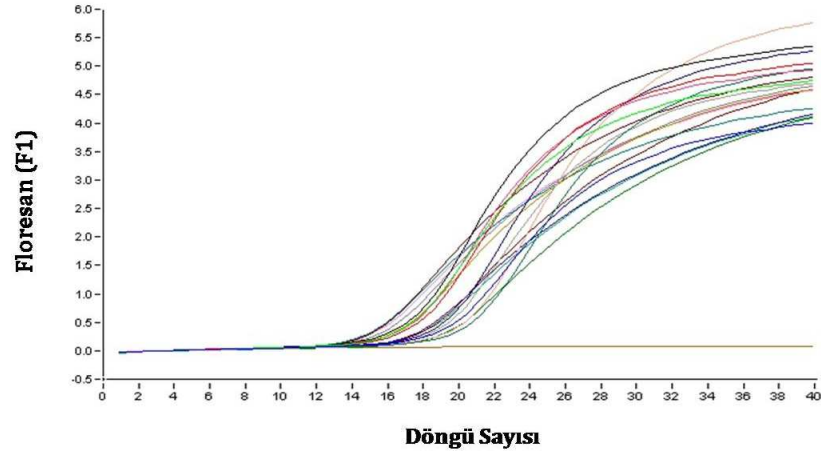
Şekil 7. Hasta ve kontrol dokularında GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadenmesini gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi

COX-2 genine ait mRNA ifadenmesini gösteren amplifikasyon eğrisi Şekil 8’da gösterilmiştir.



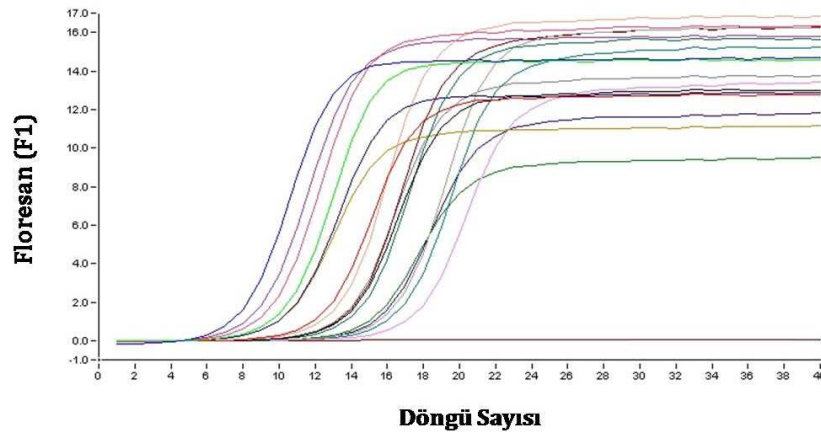
Şekil 8. Hasta ve kontrol dokularında COX-2 geninin mRNA düzeyinde ifadenmesini gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi

ALOX12 genine ait mRNA ifadelenmesini gösteren amplifikasyon eğrisi Şekil 9’da gösterilmiştir.



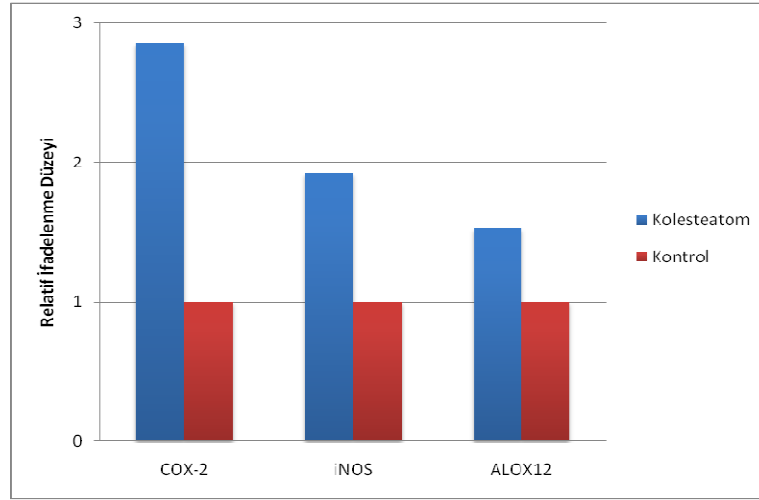
Şekil 9. Hasta ve kontrol dokularında ALOX12 geninin mRNA düzeyinde ifadelenmesini gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi

iNOS genine ait mRNA ifadelenmesini gösteren amplifikasyon eğrisi Şekil 10’de gösterilmiştir.



Şekil 10. Hasta ve kontrol dokularında iNOS geninin mRNA düzeyinde ifadelenmesini gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi

Hastalara ait kolesteatom dokuları ile sağlıklı epitel dokuları (dış kulak yolu epiteli) karşılaştırıldığında COX-2, iNOS ve ALOX12 genlerinin ifadenme miktarlarında artış olduğu bulunmuştur (Şekil 11).



Şekil 11: Kolesteatom ve sağlıklı kontrol dokularındaki COX-2, iNOS ve ALOX12 genlerinin göreceli mRNA ifadenme seviyeleri. Genlerin kontrol dokusundaki ifadenme düzeyi 1 birim kabul edilerek, kolesteatom dokusundaki değişimleri gösterilmiştir.

Bu üç genin ifadenme miktarında gözlenen değişiklikler istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde; kolesteatom dokularında COX-2 geninin ifadenme miktarında yaklaşık 3 katlık artış olduğu ve bu artışın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p = 0,007$). Buna karşın iNOS geninin transkripsiyonundaki 2 katlık artışın, kolesteatom dokuları ile sağlıklı kontrol dokuları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p = 0,117$). Ayrıca ALOX12 geninin ifadenme miktarına bakıldığında kolesteatom dokuları için belirlenen yaklaşık 1,5 katlık artmanın da istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p = 0,144$) (Tablo 9).

Tablo 9: Kolestatom örnekleri ve sağlıklı kontrol dokularında araştırılan genlerin ifadenme seviyesine ilişkin istatistiksel veri

Gen	İfadenme	Standart Hata	%95 Güven Aralığı	P değeri
GAPDH	1,000	0,536 - 1,963	0,345 - 3,764	1,000
COX-2	2,854	1,602 - 5,047	0,835 - 9,165	0,007
iNOS	1,921	0,740 - 5,120	0,324 - 11,210	0,117
ALOX12	1,529	0,900 - 2,616	0,644 - 3,933	0,144

5. TARTIŞMA

Kronik orta kulak iltihabı (KOM) ile ilişkili klinik tablolara baktığımızda kolesteatom mevcudiyeti ile birlikte hastalığın çok farklı bir seyir aldığını görmekteyiz. Bu seyir hemen her zaman olumsuz ve zorlu olmaktadır. Kolesteatom dokusuna bu kötü şöhreti sağlayan özelliği, yıkıcı ve lokal invaziv yapısıdır. Her ne kadar bu özellik, makroskopik olarak temporal kemik ile ilişkili anatomik sınır ve komşuluklarda defekt olarak izlense de, salt kitlesel etkisi dışında ona eşlik eden kronik inflamasyon sürecinin de bu yıkıma çok önemli bir katkısı vardır. Ancak kolesteatom dokusu içinde süre gelen kronik inflamasyonun ultrastrüktürel organizasyonunu anlamak için hem hücresel hem moleküler hem de genetik düzeyde neler olup bittiğine detaylı bir bakış atmak gerekir.

Kolesteatom mikro çevresinde süre gelen kronik inflamasyonda tetik çekici yapı, orta kulak, antrum mastoideum ve mastoid havalı hücrelerde yerleşik keratinize çok katlı yassı epitel dokusudur. Adı geçen anatomik boşluklar için patolojik olan bu doku, kronik inflamasyonun ateşini yakan çok çeşitli sitokinler ve mediatörler üretir. Bu sitokin ve mediatör bombardımanı altında immünolojik olarak aktive olan T-hücreleri ve makrofajlar, kolesteatom dokusunda birikmeye başlar. Böylelikle kolesteatom merkezinde yani matriks dokusunda kronik inflamasyon başlamış olur. Ayrıca aynı anda süperpoze olan bakteriyel enfeksiyon ve hatta biofilm formasyonu kolesteatom dokusuna ek yıkıcı karakterini kazandırır (72). Hastalığın bu aşamasında kolesteatom dokusunda yer alan ve inflamasyonda görevli çok çeşitli sitokinlerin varlığı gösterilmiştir. Örneğin

interlökin-1, transforming growth factor-alpha (TGF-alpha), epidermal growth factor (EGF) ve platelet derived growth factor (PDGF) bunların en belli başlı olanlarıdır (1).

İnflamasyonun başlamasını ve gelişim basamaklarını katalizleyen kilit enzimlerin hangi aşamalarda nasıl sentezlendiği ve inflamasyon için taşıdıkları kritik önemden bahsetmiştik. Ayrıca kronik inflamasyonun sadece yaralanmalar neticesinde gelişen doku hasarlarını onarım için ortaya çıkan basit birer reaksiyon dizisi olmadığından, kanser başta olmak üzere kardiyolojik, pulmoner, metabolik (diabetes mellitus vb.) ve nörolojik birçok kronik hastalık grubunda da önemli roller üstlendiğinden de bahsetmiştik. Mesela i-NOS enzimini üreten genin birçok kanser türünde normalden fazla ekspresye (overekspresyon) olduğunu gösteren çalışmalar bu düşüncenin en önemli kanıtlarıdır. Başta over olmak üzere baş boyun, özefagus, akciğer, prostat, safra kesesi ve pankreas kaynaklı kanserlerde i-NOS gen overekspresyonu gösterilmiştir. Öte yandan bir diğer kilit enzim olan ALOX-12'yi sentezleyen genle ilgili çalışmalarda göstermiştir ki, bu enzim başta kolon olmak üzere, prostat, mide ve cilt kanserlerinde de normalden fazla sentezlenmektedir. İnflamasyon için büyük öneme sahip bu iki kilit enzimin bu kadar çeşitli kanser türlerinde artış gösterdiğinin saptanması, inflamasyonun organizma yararına olan sonuçları yanında tam olarak net ortaya konamayan –ki çalışmamızda bu soruya ışık tutmayı amaçlıyoruz- belki bir çeşit yan etkileride mevcuttur. Fakat şunu rahatlıkla belirtmek gerekir ki çalışmamız genetik düzeyde hatta m-RNA düzeyinde yapılan bir çalışma olduğu için, en azında bu iki enzimin anlamsız olan artışı i-NOS ve ALOX-12'nin kolesteatom dokusunun gelişiminde

doğrudan bir rol oynamadığını göstermektedir. Çalışmamızın sağladığı bilgiler ışığında, literatürde kolesteatom dokusunda i-NOS seviyesinde artışın olduğunu belirten çalışmaları kontaminasyona bağlamak yanlış olmayacaktır.

Kolesteatom dokusunu sadece temporal kemik içerisinde ki makroskopik (kitlesel) yapısı ile değerlendirdiğimiz zaman ona son ek olarak takılan –oma’nın yanlış bir adlandırma olmadığı söylenebilir. Ancak bu kitlesel görünümün kolesteatoma karakteristik yapısını kazandıran yoğun keratin birikimine bağlı olduğundan ve bunun da benign lezyonlarda görülen hücresel bir organizasyon olmadığından dolayı, kolesteatomun tanımının yapıldığı ilk dönemden bu yana yanlış bir adlandırma olarak kullanıldığını söylemek hata olmayacaktır. Keratin birikimine çeşitli derecelerde keratinosit disregülasyonu, hiperproliferasyon ve diferansiyasyonda değişimler eşlik etmektedir (1). Kolesteatom dokusundaki bu hiperproliferasyon önemli genlerin overekspresyonu ve artmış inflamatuvar sitokin ve büyüme faktörlerine bağlanabilir (1). Ki-67 (bölünen hücrelerin ekspresse ettiği yüzey antijeni), PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ve TM (trombomodulin) gibi çoğalan hücrelerde tespit edilen markırlar kolesteatom dokusunda da saptanmıştır (1). Ancak bu proliferasyon hiç bir şekilde benign ya da malign yeni oluşumlardaki organizasyonla bir tutulamaz. Zaten hali hazırda elimizdeki DNA (deoksi ribonükleik asit) bazlı flow sitometrik çalışmalarda gösteriyor ki kolesteatom dokusunda neoplazilerdeki genetik instabilite yoktur (73). COX-2’yi sentezleyen gen uyarılara erken cevap veren, büyüme faktörleri, tümör promotorları, onkogenler ve karsinogenlerle artmış ekspresyon gösterebilen önemli inflamatuvar bir gendir (74). Normal dokularda ölçülemeyecek düzeylerde

iken, pro-inflamatuvar ve mitojenik uyarılar sonrası, özellikle inflamasyon alanında ve bazı neoplastik gelişim sürecinde ekspresyonu ve düzeyi artmaktadır (75, 76). Çalışmamızda saptanan kolesteatom dokusunda COX-2 düzeyinde ki artış dokuda süregelen inflamatuvar hadise ile açıklanamaz. Çünkü bu bir inflamatuvar yanıt olsaydı, İ-NOS ve ALOX-12 düzeylerinde de artış anlamlı boyutlarda olurdu. Dolayısıyla bu noktada, COX-2'nin onkogenler, tümörsüpressör genler ve diğer büyüme faktörleri ile olan ilişkisini anlamak, COX-2 ile kolesteatom arasındaki bağlantıyı ortaya koymak adına faydalı olacaktır.

COX-2 geni başta ras ve scr gibi onkogenler dışında, İL-1, hipoksi, EGF, transforming growth factor-beta ve tumor necrosis factor (TNF) tarafından uyarılırken; deksametazon, antioksidanlar ve p53 tarafından süprese edilir. COX-2 uyarılınca, miktarında artışla birlikte prostaglandin-E2 sentezini artırır. PG-E2 ise apoptozu inhibe eden ve İL-6 miktarını arttıran bcl-2'yi stimüle eder (77). Bu da gösteriyor ki COX-2 ile apoptoz arasında muhtemelen bcl-2 ve p53 aracılığıyla ters bir ilişki mevcut (78, 79). Çünkü vahşi tip p53, COX-2 transkripsiyonunu engellerken, mutant formunu barındıran kanser tiplerinde artmış COX-2 düzeyleri dikkati çekmektedir (78). Diğer yandan COX-2 ile bcl-2 arasında doğru bir ilişki mevcuttur. COX-2 düzeylerinde ki artış bcl-2 miktarını arttırıyor gibi görünmektedir (79). Ayrıca EGF'nin kendisi ve EGFR sinyal iletim yollarında gelişen regülasyon hataları COX-2 düzeylerinde artışa neden olmaktadır (76). EGFR/Ras yolunda oluşan aktivasyon özellikle baş boyun yassı hücreli kanserlerinde COX-2 overekspresyonu ile sonuçlanmaktadır. Larenks yassı

hücreli kanser tanısı alan 39 hastanın patolojik dokularına uygulanan spesifik COX-2 boyası ile kanser dokusunda artmış COX-2 düzeyi gösterilmiştir. Bayazıt ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışma da kanserli dokunun çevresinde yerleşik normal larengeal doku kontrol olarak kullanılmış ve aynı şekilde spesifik COX-2 boyası ile boyanmıştır. Ancak COX-2 seviyesindeki artış sadece kanserli dokuda saptanmıştır. Böylelikle literatüre “COX-2 nin malign olaylarda göstermiş olduğu artışı işaret eden diğer bir çok çalışma gibi” önemli bir katkı sağlanmıştır (74). Daha öncede belirttiğimiz gibi, literatüre baktığımız zaman COX-2 nin artmış düzeylerde saptandığı birçok kanser türü ile karşılaşmaktayız. Başta kolorektal olmak üzere, pankreas ve serviks kanserlerinde COX-2’nin artmış düzeyleri saptanmıştır (80). Bu molekülün (COX-2) karsinogenez ile ilişkisini sağlayan en önemli özelliği molekülün mitogenezi başta olmak üzere hücrel adezyonu, apoptozu ve angiogenezi etkileme kapasitesidir (51,81,82,83).

Çalışmamızda saptanan ve salt inflamatuvar mikroçevre ile açıklanamayan COX-2 overekspresyonu muhtemelen onkogen ve tümör süpressör genler ile ilişkili gibi görünmektedir. Tüm bu moleküler ve genetik göstergelere ek olarak kolesteatom dokusun özellikle yıkıcı ve lokal invaziv yapısı ile alakalı bir diğer molekülle sergilediği yakın ilişkiden bahsetmek yerinde olacaktır. Özellikle son yıllarda kanser metastazı ile ilişkili tutulan matriks metallo proteinazların kolesteatom dokusunda artmış düzeylerde olduğu bir gerçektir. Bir diğer önemli noktada COX-2 seviyesinde artışın bazı malign tümörlerde artmış MMP seviyelerine dolayısıyla da artmış metastaz kapasitesine sebep olduğunun

bilinmesidir (84,85). Dolayısıyla kolesteatomun yıkıcı ve invaziv yapısı bünyesinde göstermiş olduğu COX-2 over ekspresyonuna bağlanabilir.

6. SONUÇ

Normal dış kulak yolu epiteli ve kolesteatom dokusu moleküler düzeyde farklı davranışlar sergilemektedir. Kolesteatom dokusunda COX-2 mRNA seviyesi kontrol dokusuna göre anlamlı artış göstermektedir. COX-2 geninin inflamasyon dışında özellikle benign ve malign neoplazilerle olan yakın ilişkisi pek çok araştırma ile de saptanmıştır. COX-2 gen over ekspresyonu kolesteatom patogenezinde rol oynuyor gibi görünmektedir. Kolesteatom dokusunun genetik ve moleküler düzeyde sergilediği karmaşık yapı; onu, basit inflamatuvar ve infeksiyöz hastalık zeminden çıkartıp, bazı benign ya da malign neoplazilerle aynı davranışların sergilendiği daha kompleks bir boyuta taşıyor görünmektedir. Ancak çalışmamızın yorumu kolesteatomu neoplazi boyutuna taşımak şeklinde değil, COX-2 genindeki over ekspresyon ile yıkıcı ve mortal yapısının ilişkisi içinde olduğunu göstermek şeklinde olmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Olszewska E, Wagner M et al. Etiopathogenesis of cholesteatoma Eur Arch Otorhinolaryngol. 2004 ;261:6-24.
2. Osma U, Cureoglu S, Hosoglu S. The complications of chronic otitis media: report of 93 cases. J Laryngol Otol. 2000;114:97-100.
3. Holly A, Sittinger M, Bujia J. Immunohistochemical demonstration of c-myc oncogene product in middle ear cholesteatoma. Eur Arch Otorhinolaryngol. 1995;252:366-9.
4. Stark T, Sudhoff H et al. Alterations of basement membrane in middle ear cholesteatoma fifth international conference on cholesteatoma and mastoid surgery. 1997.
5. Lim D, Brick H. Aural Cholesteatoma and epidermization: a fine morphological study Cholesteatoma: First International Conference 1977: pp233-252.
6. Ruedi L. Pathogenesis and surgical treatment of the middle ear cholesteatoma. Acta Otolaryngol (Stockh) 1978; 361: 1-45.
7. Soldati D. Knowledge about Cholesteatoma, from the first description to the modern histopathology 2001; 22:723-730.
8. Svane-Knudsen V. Cholesteatoma: a morphologic study of stratum corneum lipids Acta Otolaryngol. 2001;121:602-6.
9. Friedmann I. Epidermoid cholesteatoma and cholesterol granuloma. Ann Otol Rhinol Laryngol 1971; 68: 57-80.

10. Schuknecht HF. Pathology of the ear Philadelphia 1993.
11. Kemppainen HO, Puhakka HJ, Laippala PJ et al. Epidemiology and aetiology of middle ear cholesteatoma *Acta Otolaryngol.* 1999;119:568-72.
12. Nelson M, Roger G, Koltai PJ et al. Congenital cholesteatoma: classification, management, and outcome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002; 128:810-4.
13. Ratnesar P. Aeration: a factor in the sequel of chronic ear disease along the Labrador and northern Newfoundland Coast. *Cholesteatoma: First international conference* pp: 1977, 302-307.
14. Meyerhoff WL, Truelson J. Cholesteatoma staging. *Laryngoscope.* 1986 ;96:935-9.
15. Tos M. Incidence, etiology and pathogenesis of cholesteatoma in children *Adv Otorhinolaryngol.* 1988;40:110-7.
16. Mills RP, Padgham ND. Management of childhood cholesteatoma. *J Laryngol Otol.* 1991;105:343-5.
17. Sanna M, Mazzoni A, Landolfi M, Aristegui M. Treatment of petrous bone cholesteatoma *Acta Otorrinolaringol Esp.* 1994;45:143-52.
18. Saleh HA, Mills RP. Classification and staging of cholesteatoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1999;24:355-9.
19. Austin DF. Types and indications of staging. *Arch Otolaryngol.* 1969; 89:235-4257.
20. Wullstein H. Theory and practice of tympanoplasty. *Laryngoscope.* 1956;66:1076-93.

21. Bennett M, Warren F, Jackson GC, Kaylie D. Congenital cholesteatoma: theories, facts, and 53 patients Otolaryngol Clin North Am. 2006 ; 39:1081-94.
22. Derlacki EL, Clemis JD. Congenital cholesteatoma of the middle ear and mastoid. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1965 ;74:706-27.
23. Levenson MJ, Parisier SC, Chute P et al. A review of twenty congenital cholesteatomas of the middle ear in children Otolaryngol Head Neck Surg. 1986 ;94:560-7.
24. Tos M. A new pathogenesis of mesotympanic (congenital) cholesteatoma Laryngoscope. 2000 ;110(11):1890-7.
25. Koltai PJ, Nelson M, Castellon RJ et al.. The natural history of congenital cholesteatoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2002 ;128:804-9.
26. Derlacki EL, Harrison HW, Clemis JD. Congenital cholesteatoma of the middle ear and mastoid a second report presenting seven additional cases Laryngoscope. 1968 ;78:1050-78.
27. Potsic WP, Samadi DS, Marsh RR, Wetmore RF. A staging system for congenital cholesteatoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2002;128:1009-12.
28. Teed RW. Cholesteatoma verum tympani: its relationship to the first epibrachial placode. Arch Otolaryngol 1936;24:455-74.
29. Michaels L. Origin of congenital cholesteatoma from a normally occurring epidermoid rest in the developing middle ear. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 1989;15:51-65.

30. Levenson MJ, Michaels L, Parisier SC et al. Congenital cholesteatomas in children: an embryologic correlation *Laryngoscope*. 1988 ;98:949-55.
31. Sadé J, Babiacki A, Pinkus G. The metaplastic and congenital origin of cholesteatoma *Acta Otolaryngol*. 1983;96:119-29.
32. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 97–120.
33. Wendt H. Desquamative Entzündung des Mittelohres (“Cholesteatom des Feslenbeins”). *Arch Ohr Nasen Kehlkopfheil* 1873; 14:428-446 .
34. Sadé J. Cellular differentiation of the middle ear lining *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1971;80:376-83.
35. Sadé J. The atelectatic ear. Churchill Livingstone, New York 1979.
36. Foy CA, Parkes HC. Emerging Homogeneous DNA-based Technologies in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry* 2001; 47: 990–100055.
37. Bezold F. Cholesteatoma, Perforation der Membrana Flaccida und Tubenverschluss: *Z. Ohrenheilkd* 20:5-29.
38. Habermann J. Zur Entstehung des Cholesteatoms des Mittelohres. *Arch Ohrenheilkd* 1888; 27:43-51.
39. Friedmann I. The comparative pathology of otitis media, experimental and human. II. The histopathology of experimental otitis of the guinea-pig with particular reference to experimental cholesteatoma. *J Laryngol Otol*. 1955 ;69:588-601.

40. Sudhoff H et al. Basement membrane in middle ear cholesteatoma: Immunohistochemical and ultrastructural observations. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996; 105:804-810.
41. Sadé J. Ossicular damage in chronic middle ear inflammation *Acta Otolaryngol.* 1981;92:273-83.
42. Sudhoff H, Bujía J, Fisseler-Eckhoff A, Holly A, Schulz-Flake C, Hildmann H. Expression of a cell-cycle-associated nuclear antigen (MIB 1) in cholesteatoma and auditory meatal skin *Laryngoscope.* 1995;105:1227-31.
43. Park K, Park HJ, Chun YM. Immunohistochemical study on proliferative activity of experimental cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2001;258:101-5.
44. Bujía J, Schilling V, Holly A, Stammberger M, Kastenbauer E. Hyperproliferation-associated keratin expression in human middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.* 1993 ;113:364-8.
45. Albino AP, Reed JA, Bogdany JK, Sassoon J, Desloge RB, Parisier SC. Expression of p53 protein in human middle ear cholesteatomas: pathogenetic implications 1998;19:30-36.
46. Yang K, Ma W, Liang H, Ouyang Q, Tang C, et al. Dynamic simulations on the arachidonic acid metabolic network. *PLoS Comput Biol* 2007; 3: 523-30.
47. Aggarwal BB, Sandur SK, Shishodia S, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and Cancer: How hot is the link? *Biochemical pharmacology* 2006; 72: 1605-21.

48. Soberman RJ, Christmas P. The organization and consequences of eicosanoid signaling. *J Clin Invest* 2003; 111: 1107-13.
49. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 145–82.
50. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996; 271: 33157-60.
51. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L. Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal* 1998; 12: 1063-73.
52. Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1299: 125-40.
53. Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome Biology* 2004; 5: 1-7.
54. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: A Therapeutic Target. *Annu. Rev. Med* 2002; 53: 35–57.
55. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science* 2001; 294: 1871–5.
56. Yoshimoto T, Yamamoto S. Arachidonate 12-lipoxygenase. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1995; 12: 195–212.
57. Kuhn H, Thiele BJ. The diversity of the lipoxygenase family-many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett* 1999; 449: 7–11.

58. Furstenberger G, Krieg P, Muller-Decker K, Habenich AJR. What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis? *Int J Cancer* 2006; 119: 2247-54.
59. Pidgeon GP, Nie D, Krishnamoorthy S, Honn KV. Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 503–24.
60. Kuhn H, O'Donnel VB. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. *Prog Lipid Res* 2006; 45: 334-56.
61. Banerjee S, Erdog A. ALOX12 (Arachidonate 12-Lipoxygenase) Homo sapiens 2007.
62. Ding XZ, Hennig R, Adrian TE. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. *Molecular Cancer* 2003; 2: 10.
63. Kirtsreesakul V. Update on Nasal Polyps: Etiopathogenesis. *Med Assoc Thai* 2005; 88: 1966-72.
64. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
65. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993; 54: 171-8.
66. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004; 75: 639–53.
67. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-42.

68. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; 11: 1026-30.
69. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The Real-time Polymerase Chain Reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95-125.
70. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 2002-7.
71. Walker NJ. A technique whose time has come. *Science* 2002; 296: 557-9.
72. Richard A. Chole, MD, PhD; Brian T. Faddis, PhD. Evidence for Microbial Biofilms in Cholesteatomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128:1129-1133.
73. Desloge RB, Carew JF, Finstad CL et al. DNA analysis of human cholesteatomas *Am J Otol.* 1997 ;18:155-9.
74. Bayazit YA, Buyukberber S, Sari I, Camci C, Ozer E, Sevinc A, Karakok M, Kanlikama M, Mumbuc S. Cyclo-oxygenase 2 expression in laryngeal squamous cell carcinoma and its clinical correlates. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2004; 66:65-9.
75. Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol.* 2001 ;2:544-51.
76. Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, et al. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:429–434.

77. Fosslie E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:3–21.
78. Leung WK, To KF, Ng YP, et al. Association between cyclo-oxygenase-2 overexpression and missense p53 mutations in gastric cancer. *Br J Cancer* 2001;84:335–339.
79. Mestre JR, Subbaramaiah K, Sacks P, et al. Retinoids suppress epidermal growth factor induced transcription of cyclooxygenase-2 in human oral squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 1997;57:2890–2895.
80. Young JL, Jazaeri AA, Darus CJ, Modesitt SC. Cyclooxygenase-2 in cervical neoplasia: a review *Gynecol Oncol*. 2008;109:140-5.
81. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors *Cancer Res*. 2000;60:1306-11
82. Toynbee J. *Malluscoum contagiosum*. *London Med Gaz* 1850;11:811.
83. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*. 1999;18:7908-16.
84. Morales DS, Penido Nde O, da Silva ID, Stávale JN, Guilherme A, Fukuda Y. Matrix metalloproteinase 2: an important genetic marker for cholesteatomas. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)*. 2007;73:51-7.
85. Tsujii M, Kawano S, Du Bois RN: Cyclo-oxygenase-2 expression in human colon cancer increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3336–3340.

ÖZET

Amaç: Üç ana inflamatuvar gen COX-II (silooksijenaz-II), ALOX-12 (araşidonat lipooksijenaz-12) ve i-NOS (indüklenabilir nitrik oksit sentetaz) gen düzeylerinin kolesteatom dokusundaki kantitatif ekspresyon miktarının transkripsiyonel seviyede ölçümü.

Metod: Çalışmaya primer akkiz kolesteatom tanılı 10 hasta dahil edildi. Operasyon sırasında kolesteatom matriksinden ve kontrol dokusu olarakta dış kulak yolu derisinden örnekler elde edildi. Dokulardaki gen oranları real time quantitative polimerase chain reaction (RT-PCR) tekniği kullanılarak değerlendirildi. İlk olarak kolesteatom matriks dokusu ve dış kulak yolu derisinden total RNA izole edildi. Daha sonra reverse transcriptase-PCR yöntemiyle komplementer DNA elde edildi. Elde edilen ekspresyon oranları ana housekeepin gen olan gliseraldehit 3 fosfat dehidrojenaz ile karşılaştırıldı.

Sonuçlar: Kolesteatom matriks dokusu ile dış kulak yolu derisi karşılaştırıldığında, COX-II m RNA seviyesinde anlanlı artış saptanmasına rağmen ($p = 0.038$), i-NOS ve ALOX-12 gen seviyelerindeki artış anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Tartışma: COX-II m RNA ekspresyon seviyesindeki anlamlı artış, kolesteatom matriks dokusu ve dış kulak yolu derisinin moleküler seviyede farklı biyolojik karakterlere sahip olduğunu ve COX-II nin kolesteatom patogenezinde rol aldığını göstermektedir. Bu artış bazı benign ve malign neoplazilerdeki bulgularla benzerlik göstermektedir. Ancak bu bulgular tek başına kolesteatomun neoplazi

olduğunu söylemeye yetmez. ALOX-12 ve i-NOS seviyelerinde gözlenen anlamlı olmayan artış, bu genlerin kolesteatom patogenezi ile ilişkisinin olmadığını göstermektedir. Ayrıca bu genlerin diğer çalışmalarla gösterilebilecek olan artışları, kolesteatoma eşlik eden inflamasyona bağlanabilir.

Anahtar kelimeler: Kolesteatom, COX-II, iNOS, LOX-12

SUMMARY

Objective: To assess expression of three main inflammatory genes, COX-II, ALOX-12 and i-NOS, quantitatively at transcriptional level in cholesteatoma tissue.

Methods: Ten patients with cholesteatoma were included in this study. During operation, tissue samples obtained from cholesteatoma matrix and external ear canal skin (control tissue), and expression of the genes, COX-II, i-NOS and LOX-12, were assessed using real time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. Initially, total RNA was isolated from cholesteatoma tissue and external ear canal skin, and then complementary DNA was yielded by using reverse transcriptase-PCR method. Expression levels were compared with the main housekeeping gene, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Results: The COX2 mRNA levels were significantly higher in cholesteatoma matrix compared to control skin samples ($p = 0.038$) whereas there was no statistically significant difference in the expression of iNOS and LOX12 mRNA levels ($p > 0.05$).

Conclusion: There is a significant overexpression of the mRNA of COX-II in cholesteatoma, which indicates a difference between the normal skin and cholesteatoma matrix at molecular level. That is, COX-II gene overexpression seems associated with pathogenesis of cholesteatoma. That molecular change is similar to the molecular abnormalities observed in some benign and malignant neoplastic diseases. However, with the findings of this study, it is not possible to

speculate that cholesteatoma is a sort of neoplastic process. Absence of an increase in the gene expressions of LOX-12 and i-NOS indicates that these enzymes are not related to occurrence of cholesteatoma, and any detection of these enzymes in cholesteatoma cases in the other studies is attributable to coexisting inflammation secondary to the ear disease.

Key words: Cholesteatoma, COX-II, iNOS, LOX-12

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Tolgahan

Soyadı : Çatlı

Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara, 1980, evli, Eylül isimli 1 kız çocuğu sahibi

Eğitimi:

2004-2009 Gazi Üniversitesi KBB Anabilim Dalı asistanlık eğitimi

1998-2004 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

1991-1998 Adana Özel Gündoğdu Lisesi

Yabancı Dili : İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Türk Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Derneği, Türk Rinoloji Derneği

Bilimsel Etkinlikleri:

- XI. Uluslar arası Fasiyal Sinir Sempozyumunda Konuşmacı Katılım için TÜBİTAK bursu.
- XI. Uluslar arası Fasiyal Sinir Sempozyumunda (Nisan 2009, Roma, İtalya)
“Facial reanimation with end to end hypoglossofacial anastomosis: 20 years’ experience” konu başlıklı sözel sunum
- XI. Uluslar arası Fasiyal Sinir Sempozyumunda (Nisan 2009, Roma, İtalya)
“Endoscope assisted microvascular decompression for hemifacial spasm: An analysis of 12 patients” konu başlıklı sözel sunum.
- VIII. Uluslar arası Kolestatom Kongresinde Ödüllü Proje Yarışmasında Finalist

- 'Facial reanimation with end to end hypoglossofacial anastomosis: 20 years' experience' by T Catli, YA Bayazit, O Gokdogan, N Goksu - Journal of Laryngology and Otology (Basım aşamasında)
- “Burun Kanamaları”, Türkiye Klinikleri Dergisi KBB Acilleri Özel Sayısı – S. Özbilen, T.Çatlı
- Rush Üniversitesi (Chicago, Illinois, USA) KBB Anabilim Dalında Eylül-Kasım 2009 tarihleri arasında klinik bilgi ve beceriyi geliştirme amaçlı klinik gözlemci olarak ziyaret.