



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Милан Ердоглија**

**ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ МАРКЕРА ЋЕЛИЈСКЕ ПРОЛИФЕРАЦИЈЕ**  
**И ИНФЛАМАЦИЈЕ У РАЗВОЈУ СТЕЧЕНОГ ХОЛЕСТЕАТОМА**  
**СРЕДЊЕГ УВА**

**Докторска дисертација**

**Ментор: проф.др Ненад Балетић**

**Крагујевац, 2016.године**

# САДРЖАЈ

<b>1. УВОД .....</b>	<b>1</b>
1.1. Историјат .....	1
1.2. Дефиниција .....	1
1.3. Епидемиолошке карактеристике холестеатома .....	2
1.4. Класификација холестатома .....	2
1.4.1. Етиолошка класификација холестеатома .....	3
1.4.2. Топографска класификација холестеатома .....	3
1.4.3. Клиничка класификација холестеатома .....	4
1.5. Анатомске карактеристике средњег ува .....	4
1.6. Клиничке карактеристике холестеатома .....	5
1.7. Патохистолошке карактеристике холестеатома .....	7
1.8. Имунохистохемијске карактеристике холестеатома .....	8
1.9. Етиопатогенеза стеченог холестеатома .....	10
1.10. Дијагноза стеченог холестеатома .....	16
1.11. Хируршко лечење стеченог холестеатома .....	20
<b>2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИТРАЖИВАЊА .....</b>	<b>22</b>
<i>Циљеви истраживања</i> .....	22
<i>Хипотезе истраживања</i> .....	22
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД .....</b>	<b>24</b>
3.1. Дизајн студије .....	24
3.2. Испитаници .....	24
3.3. Клиничка истраживања .....	24
3.4. Узорковање материјала .....	26

3.5. Хистопатолошка испитивања .....	26
3.6. Имунохистохемијско бојење парафинских исечака .....	28
3.7. Имунохистохемијско бојење криостатских исечака .....	28
3.8. Имунохистохемијска анализа .....	29
3.9. Снага студије и величине узорака .....	30
3.10. Статистичка обрада података .....	30
<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b>	
4.1. Основне карактеристике испитаника .....	32
4.2. Интраоперативни налаз .....	33
4.3. Испитивање клиничких карактеристика холестеатома .....	37
4.4. Испитивање хистопатолошких карактеристика холестеатома .....	39
4.5. Испитивање имунохистохемијских карактеристика холестеатома .....	44
4.6. Однос клиничких, хистопатолошких и имунохистохемијских карактеристика холестеатома .....	58
4.7. Корелација патохистолошких карактеристика холестеатома.....	65
4.8. Корелација имунохистохемијских маркера.....	68
<b>5. ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>75</b>
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ .....</b>	<b>85</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>86</b>

## 1.УВОД

### 1.1. Историјат

Термин холестеатом први је употребио *Johannes Muller* 1838.године описујући слојевити перласти тумор ува састављен из масти који се разликује од осталих тумора присуством билијарних масти или холестирина распоређеног између слојева ћелија са акумулацијом кератина у виду концентричних прстенастих слојева <sup>(1)</sup>. Пре *Johannes Muller*-а још 1683. године *Du Verneey* је назвао стеатомом, масу сличну тумору између церебелума и церебрума. Француски патолог *Curveillier* описао је 1829. године патолошке карактеристике сличне холестеатому и такву лезију је назвао „перласти тумор“. Термин холестеатом је у ствари погрешан, јер се не ради о правом тумору и овај псеудотумор не садржи увек холестерол <sup>(1)</sup>. *Schuknecht* и сарадници су дуго протажирали термин „кератом“, али се на крају ипак задржао назив холестеатом који је и данас у употреби <sup>(2)</sup>. Почетком ере хирургије ува отпочето је и хируршко лечење холестеатома ува. Прву мастоидектомију су урадили *Hermann Schwartze* и *Adolf Eysell* још 1873. године <sup>(3)</sup>. До 1950. године рађене су мастоидектомије и тимпанопластике због холестеатома, да би *House* и *Wullstein* увели микроскопску хирургију ува <sup>(4)</sup>. И данас је хирургија ува једина терапија за холестеатом, али је она софистицирана, не може се замислити без микроскопа и претходне радиолошке дијагностике.

### 1.2. Дефиниција холестеатома

Холестеатом представља цистичну, бенигну, псеудотуморску израслину, ограничену кератинизираним сквамозним епителом са стромом од гранулационог ткива, која се јавља на разним местима у организму, између осталог и унутар средњег ува. *Gray* је 1964.године приказивао холестеатом као „кожа на погрешном месту“, без длака и жлезда, док је *Sade* 1993.године дефинисао холестеатом као „постојање сквамозног епитела у бубној дупљи која производи макроскопске количине кератина“ <sup>(5, 6)</sup>. Холестеатом се карактерише прогресивним растом који је често праћен деструкцијом слузнице средњег ува, деструкцијом слушних кошчица и суседних коштаних структура. Холестеатом се

клинички манифестује наглувошћу, фетидном секрецијом из ува, ређе болом и зујањем у уву, вртоглавицама и сметњом равнотеже. Отомикроскопским прегледом се обично види кератински дебрис у пределу ивичне перфорације бубне опне, често са знацима истовремене инфекције у виду гнојне секреције, гранулација или полипа у уву. Холестеатом представља једну од најопаснијих болести средњег ува обзиром да може досвести до егзокранијалних и интракранијалних компликација.

### **1.3. Епидемиолошке карактеристике холестеатома**

У европској популацији холестеатом средњег ува се јавља са средњом годишњом инциденцом од 9,2 (између 3,7-13,9) на 100 000 становника <sup>(2)</sup>. Инциденца је највећа у популацији мушкараца старости око 50 година. Не постоји статистички значајна разлика у појави холестеатома средњег ува према социјалном статусу. Већина пацијената са холестеатомом (72,4%) пати од хроничних епизода супуративне медије. Бактеријска инфекција код холестеатома је доказана брисом ува у 85% случајева, при чему су пасивна инфекција и присуство биофилма готово обавезни <sup>(2, 7)</sup>. Појава холестеатома иза интактне бубне опна, без историје о хроничној медији верификована је у 0,6%, док је појава холестеатома средњег ува у пацијената са расцепом непца забележена у 8% случајева <sup>(2)</sup>. Код оперисаних пацијената са холестеатомом, претходно су уграђиване аерационе цевчице (10,2%), рађена је аденоидектомија или тонзилоаденоидектомија (15,9%), а у преко 80% случајева није рађена нити једна од наведених операција <sup>(7)</sup>.

### **1.4. Класификација холестеатома**

Холестеатоми се могу груписати на основу: етиологије, топографије и клиничких карактеристика

#### *1.4.1. Етиолошка класификација холестеатома*

Холестеатоми се према етиолошкој класификацији деле на конгениталне и стечене. Конгенитални холестеатоми настају из ембриолних остатака епитела и обухватају

холестеатоме у понтоцеребеларном углу, у пирамиди темпоралне кости, а ређе у мастоидном наставку и средњем уву где се јављају иза интактне бубне опне <sup>(8, 9)</sup>. У стечене холестеатоме се сврставају холестеатоми спољашњег слушног ходника и средњег ува. Према стању бубне опне, стечени холестеатоми средњег ува се деле на примарне и секундарне. Примарно стечени холестеатоми су праћени променама на бубној опни у виду ателектазе и ретракционог цепа који настају услед инвагинације или ретракције дела или целе бубне опне <sup>(10)</sup>. Секундарно стечени холестеатоми настају урастањем епидерма из унутрашњег, коштаног дела спољашњег слушног ходника или преко рубова већ постојеће перфорације бубне опне у кавум тимпани. Стечени холестеатоми такође могу настати након опструкције спољашњег слушног ходника остеоом или фиброзном дисплазијом темпоралне кости <sup>(11, 12)</sup>. Групи ретко стечених холестеатома средњег ува припадају и изузетно ретки имплантациони холестеатоми који настају урастањем епидерма у средње уву након операције на бубној опни или средњем уву или након фрактуре темпоралне кости <sup>(13, 14, 15)</sup>.

#### *1.4.2. Топографска класификација холестеатома*

Према топографској класификацији холестеатоми се деле на холестеатоме темпоралне кости, холестеатоме средњег ува, холестеатоме спољашњег слушног ходника и ектопичне холестеатоме <sup>(10)</sup>. Холестеатоми темпоралне кости су најчешће конгенитални, локализовани у пределу врха пирамиде или у понтоцеребеларном углу, а ређе у мастоидном наставку, са још ређом пропагацијом у средње уво <sup>(8)</sup>. Холестеатоми средњег ува су угловном стечени и о њима ће овде бити речи. Холестеатоми спољашњег слушног ходника су локализовани на поду и у коштаном трећини слушног канала, изгледа су локалног дивертикулума <sup>(16)</sup>. Ретко холестеатом може настати између слојева бубне опне (интратимпанични холестеатом) <sup>(17)</sup>. Ектопични холестеатоми се јављају на атипичним местима заосталог ембриолошког епидерма нпр. интракранијално, у параназалним шупљинама, у плућима итд.

### 1.4.3. Клиничка класификација холестеатома

Према клиничким карактеристикама холестеатоми могу бити примарни и рецидивирајући. Примарни холестеатоми могу бити атик, парс тенза холестеатоми и холохолестеатоми у зависности од примарне локализације појаве холестеатома на бубној опни, где захватају само парс флакциду, парс тензу или целу бубну опну<sup>(10)</sup>. Рецидивирајући холестеатоми се јављају након операције холестеатома и могу бити резидулани и рекурентни. Резидуални холестеатоми се развијају од остатака холестеатома, од некомплетно уклоњених холестеатомских перли и најчешће се јављају у синусу тимпани, фацијалном рецесусу и супратубарној регији, са инциденцом од 20 - 50% у педијатријској популацији<sup>(18, 19, 20)</sup>. Рекурентни холестеатоми настају постоперативно, након поновног успостављања патогенетских услова за развој холестеатома, као нпр. формирањем ретракционих цепова на бубној опни или неомембрани услед хиповентилације средњег ува<sup>(18, 21)</sup>.

### 1.5. Анатомске карактеристике средњег ува

Средње уво је сложен систем спојених шупљина у темпоралној кости, смештених између спољашњег и унутрашњег ува. Средишњи део је бубна дупља (*cavum tympani*), предворје (*antrum*) и мастоидне ћелије су позади, а еустахијева туба (*tuba auditiva*) је напред. Бубна дупља се налази медијално од бубне опне а латерално од лабиринтног зида који је дели од унутрашњег ува. Лабиринтни зид, површине око 1cm<sup>2</sup> је хируршки нарочито значајан, јер је на њему описано око 150 анатомских детаља (*Bollobas Bela*). Најзначајнији су промоторијум, хируршко колено фацијалног канала са шпаговима (*recessus facialis* и *sinus tympani* који су често захваћени холестеатомом) и округло и овално окно (*fenestra cochlea* и *fenestra vestibuli*), два отвора који повезују бубну дупљу са унутрашњим увом<sup>(22)</sup>. У односу на положај бубне опне, бубна дупља је подељена на средњи спрат - мезотимпанум (*mesotympanum*), горњи спрат (*epitympanum*), предњи спрат (*protympanum*) и доњи спрат (*hypotympanum*). Хируршки је значајнија морфолошко-функционална подела средњег ува атикотимпаничном дијафрагмом са два мала отвора предњи и задњи тимпанични истмус (*isthmus tympanicus anticus et posticus*) за вентилацију епитимпанума,

антрума и мастоидних ћелија. Вентилација читавог средњег ува је зависна од проходности поменутих отвора на атикотимпаничној дијафрагми и Еустахијеве тубе. Функција Еустахијеве тубе је пресудна за раст и развој мастоидног наставка, који је неразвијен код новорођенчета, почиње да се формира у другој години живота и потпуно је развијен тек у трећој деценији живота <sup>(23)</sup>. У случају опструкције предњег и задњег тимпаничног истмуса и запушености Еустахијеве тубе холестатомом, гранулацијама, полипима или хиперпластичном слузницом, хируршко решавање је неопходно, при чему се Еустахијева туба може раканалисати и омогућити аерација средњег ува. За спровођење звука кроз средње уво, осим добро пнеуматиације средњег ува, неопходни су целовита бубна опна и функционалан осиклуарни ланац. Бубна опна (*membrana tympani*) је еластична мембрана која је у већем доњем делу (*pars tensa*) трослојна: плочасто слојевити епител споља, фиброзни слој у средини и једноредни епител унутра, док је мањи, горњи део бубне опне двослојан (*pars flaccida – membrana Shrapnelli*), односно без средњег фиброзног слоја. Парс флакцида и Прусаков простор су анатомски слабе тачке које се доводе у везу са појавом холестеатома. Прусаков простор (*Prussak's recessus membranae tympani superior*) је слузнични шпаг ограничен латерално парс флакцидом бубне опне, медијално вратом малеуса, супериорно латералним мелеарним лигаментом и инфериорно латералним процесусом малеуса. Осиклуарни ланац чине три најмање слушне кошчице у телу човека: чекић (*malleus*), наковањ (*incus*) и узенгија (*stapes*). Слушне кошчице су међусобно узглобљене, покретљиве уз помоћ стапедијалног и мишића затезача бубне опне и имају функцију да преносе звук од бубне опне до овалног окна (*fenestra vestibuli*) односно унутрашњег ува <sup>(24)</sup>.

## 1.6. Клиничке карактеристике холестеатома

Макроскопски холестеатом је цистична, псеудотуморска творевина која се састоји из танког епитела и беличастог, луковичастог, трошног кератина који може бити сув или влажан, у зависности од присуства или одсуства активне инфекције. У присуству инфекције, односно пурелентног секрета, гранулација или полипа, холестеатомске перле се натапају инфицираним садржајем, постају влажне и добијају жућкасту боју. Сличне су



макроскопске форме сувог и влажног холестеатома код примарног и код рецидивирајућег холестеатома. Рецидивирајући холестеатом је лакше дијагностиковати, а теже оперисати из саме чињенице да је некада раније оперисано уво због холестеатома, а да су претходном операцијом могуће измењене анатомске структуре средњег ува <sup>(25, 18)</sup>. Клиничке карактеристике примарног атик и парс тенза холестеатома се разликују. Атик (парс флаксида) холестеатом почиње ивичном атик перфорацијом са пружањем ретракционог цепа у Прусаков простор, одакле се шири уназад према атику, адитусу антрума и антруму мастоида, на доле и унутра према инкудостапедијалном зглобу и овалном и округлом окну и/или према напред ка врату манубријума и структурама мезо- и протимпанума. Парс тенза холестеатоми се деле на синус и тенза ретракциони холестеатоми. Синус холестеатоми почињу у задњим квадрантима бубне опне ивичном перфорацијом са пружањем ретракционог цепа у задњи тимпанални сегмент, ка фацијалном рецесусу и синусу тимпани. Отомикроскопски се синус холестеатоми манифестују ателектатичном бубном опном са акумулацијом кератинског дебриса који се тешко аспирира и који је често прекривен меснатим гранулацијама и полипима <sup>(26)</sup>. Из задњег тимпанума, синус холестеатоми се шире према атику кроз задњи тимпанични истмус или испод врата малеуса кроз предњи тимпанични истмус. Такође синус холестеатоми могу да испуњавају Прусаков простор, одакле се могу ширити позади, латерално од тела инкуса, између латералног малеарног набора и латералног инкудалног набора, према адитусу антрума и/или на доле између латералног и задњег малеарног набора у мезотимпанум и/или ка напред према врату малеуса, према дехисценцији у предњем малеарном набору и предњег дела *von Troeltsch* – овог цепа у протимпанум. Тенза ретракциони холестеатоми се обично манифестују у виду централне парс тенза ретракције, а касније и перфорације бубне опне са обилним акумулацијама кератина на унутрашњој страни ивица перфорације, испод остатака бубне опне <sup>(26)</sup>. Дифузни холестеатоми (холохолестеатоми) су свеобухватни, најекстензивнији од свих клиничких форми холестеатома и захватају све спратове кавума тимпани. Код дифузних холестеатома се не може разазнати примарно место јављања холестеатома, јер холестеатомске перле испуњавају потпуно кавум тимпани и не постоје видљиви остаци бубне опне <sup>(27)</sup>.

## 1.7. Патохистолшке карактеристике холестеатома

У стеченом холестеатому се могу препознати три слоја: матрикс који представља кератинизирајући вишеслојни плочасти епител, периматрикс или ламина проприја (строма) и аморфни садржај (наслоге десквамираног кератина и мртвих ћелија).

Матрикс се састоји из вишеслојног сквамозног епитела, састављеног од кератиноцита, који стварају кератин. Кератиноцити у матриксу холестеатома су правилно распоређени, слично као у епителу у неколико слојева: базални, спинозни, грануларни и рожаста слој<sup>(28)</sup>. Ћелијски и међућелијски састав матрикса је веома сличан саставу коже, с тим што недостају аднекса коже. Базални слој матрикса холестеатома (*stratum germinativum*) је изграђен од кубоидних ћелија са великим једром, са хиперхроматином, базофилног изгледа. Базалне ћелије су митотски активне, везане су хемидезмозима базалну мембрану, а дезмозомима са околним кератиноцитима. Базалне ћелије најраније стварају кератинске филаменте. Спинозни слој матрикса холестеатома (*str.spinosum*) садржи липидне ламеле и велике цилиндричне ћелије које стварају кератинске филаменте и ламенарне грануле. Грануларни слој матрикса холестеатома (*str.granulosum*) чине спљоштене ћелије са хиперхроматским кератохијелиним гранулама у којима се ствара филагрин. Рожаста слој матрикса холестеатома (*str.corneum*) представља хиперкератоточан и десквамирајући слој, састављен из више редова корнеоцита – орожалих ћелија без једра са нерастворљивим ћелијским омотачем. Корнеоцити се стварају из агрегата филагрин и цитокератинских филамената. Међућелијски простор између корнеоцита чине биламеларни липиди, церамиде и холестерол. У рожастом слоју се формирају ламеле кератина и холестеролски кристали унутар кератинског дебриса. Између грануларног и рожастог слоја понекад се идентификује *str.lucidum*. У различитим слојевима кератиноцита је испољен различит профил ситокератина – интермедијарних филамената протеинске структуре<sup>(29)</sup>. Кератиноцити могу обављати и имунорегулацију пошто су способни да секретују цитокине, да обављају фагоцитозу и могу да се трансформишу у антиген презентујуће ћелије<sup>(30)</sup>. У матриксу осим кератиноцита идентификоване су Меркелове ћелије у базалном слоју док се Лангерхансове ћелије налазе у супрабазалним слојевима. Такође интраепително су идентификовани Т лимфоцити CD4 и CD8 фенотипа, а ређе макрофаги и мастоцити<sup>(29)</sup>. Пролиферација

кератиноцита матрикса холестеатома је његова основна карактеристика, која се између осталог може верификовати и преко имунохистохемијске експресије маркера једарног антигена Ki-67 и PCNA (ћелијски једарни антиген пролиферације) <sup>(30)</sup>.

Периматрикс или ламина проприја (строма) представља део холестеатома испод матрикса. Састоји се из инфламираног субепителног везивног ткива или гранулационог ткива које је инфилтрисано запаљенским ћелијама. У субепителној зони периматрикса доминирају фибробласти, друге моноклеарне ћелије, као и полиморфонуклеарне ћелије, међу њима најзначајнији макрофаги, а повремено се виде мастоцити и плазма ћелије. Од лимфоцита доказано је присуство помоћничких (CD4) и цитотоксичних (CD8) Т лимфоцита, а мање В лимфоцита. У ламини проприји су такође нађена неправилно постављена колагена влакна, као и друге компоненте екстрацелуларног матрикса попут глукозаминогликана, протеогликана, фибронектина, витронектина, еластина и ламинина <sup>(30)</sup>.

Акумулирани кератин и мртве ћелије, углавном кератиноцити су присутни у мањем или већем обиму, обично као заробљени аморфни садржај у цистичној форми холестеатома, који испуњава пнеуматске просторе средњег ува. Кератинске масе су одличан медијум за микроорганизме, тако да се унутар њих могу наћи бактерије, бактеријски ензими, гљивице, различити антигени појединачно или у оквиру биофилма.

## 1.8. Имунохистохемијске карактеристике холестеатома

Применом имунохистохемијских метода као и техника молекуларне биологије заснованих на „*in situ*“ и „*ex vivo*“ анализи културе ткива и ћелија, омогућена су нова сазнања о патофизиологији и патохистологији холестеатома <sup>(28)</sup>. Имунохистохемијске анализе представљају врло подесне методолошке приступе јер се захваљујући огромном спектру моноклонских антитела једноставно могу идентификовати бројне ћелијске субпопулације али и проучавати експресија различитих молекула укључених у имунопатогенетска збивања <sup>(31)</sup>. Примена имунохистохемијских метода на ткивним пресецима омогућава не само идентификацију појединих ћелија или молекула већ и дистрибуцију анализираних ћелија и њихову комуникацију са суседним ћелијама као и са

ћелијама екстрацелуларног матрикса. Такође се све промене у ткиву могу квантификовати а самим тим и статистичким методама обрађивати.

Експресијом цитокератина, цитокина и пролиферативних маркера какви су PCNA и Ki-67 може се испитати пролиферација епитела. Ћелијски нуклеарни антиген пролиферације (*proliferating cell nuclear antigen* - PCNA) користи се за анализу синтезе дезоксирибонуклеинске киселине (DNA) током S фазе ћелијског циклуса, која се везује за DNA репликацију, репарацију и ћелијску апоптозу. PCNA је према томе неспецифични индикатор пролиферације епитела. Експресија PCNA је повећана у хроничним инфламаторним процесима, па је PCNA подесан маркер за испитивање пролиферације матрикса холестеатома, где је експресија PCNA већа него у епидермису. Ki-67 је једарни антиген и маркер ћелијске пролиферације који се експримује у свим активним фазама ћелијског циклуса (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> и M), док га нема у неактивној фази ћелијског циклуса (G<sub>0</sub>). Претпоставља се да је Ki-67 одговоран за кондензацију и декондензацију хромозома, заштиту и стабилизацију хромозома и регулацију симетричне расподеле једарних протеина при деоби ћелије <sup>(32)</sup>. У зависности од заступљености Ki-67 у нуклеусу, нуклеолусу или нуклеоплазми, одређује се тип ћелијске експресије Ki-67 као гранулиран, дифузан или мешовити тип <sup>(33)</sup>. Ki-67 има специфичну имунореактивност, детектибилан је у базалним и супрабазалним слојевима матрикса стеченог холестетом док се у нормалној кожи приказује у базалном слоју епитела <sup>(34)</sup>. И Ki-67 и PCNA се нарочито концентришу у меаталној кожи, близу тимпаничног анулуса, одакле се узима исечак коже спољашњег слушног ходника подесан за патохистолошку и имунохистохемијску анализу. COX-2 (*ciklooksigenaza 2*) је ензим који настаје декодирањем PTGS2 (*prostaglandin-endoperoksidne sintetaze 2*) гена, а укључен је у претварање арахидонске киселине у простагландин H<sub>2</sub> – прекурсора простагландин A<sub>2</sub> и тромбаксана A<sub>2</sub>, медијатора запаљенског процеса <sup>(35)</sup>. COX-2 је неактиван у здравим ћелијама. Активација COX-2 се одиграва у пролиферишућим ћелијама током развоја инфламаторних или туморских процеса у организму, и то као одговор на екстраћелијски стимулус, проинфламаторне цитокине или факторе ћелијског раста <sup>(36, 37)</sup>.

Експресијом ћелијских маркера имуних ћелија, какви су CD4 и CD8 Т лимфоцити у холестеатому могу се сагледати њихова дистрибуција и улога у имунолошким процесима развоја холестеатома. CD4 и CD8 Т лимфоцити су ефекторски лимфоцити који након

сазревања у лимфном чвору мигрирају на месту инфекције (холестеатом и околну кожу у овом случају) и делују као цитотоксичне одбрамбене ћелије или у хуморалном имуном одговору, као помоћничке Th1 и Th2 имуне ћелије. Имунохистохемијско мапирање омогућава идентификацију и праћење и других ћелија у холестеатому какви су макрофаги, хистиоцити, мастоцити, плазмоцити, Лангерхансове ћелије, а нарочито ћелије које су најбројније у матриксу – кератиноцити и ћелије из периматрикса – фибробласти, јер је њиховом интеракцијом инициран раст и развој холестеатома <sup>(30)</sup>. Такође, имунохистохемијски се могу изоловати и бојити структурни елементи екстрацелуларног матрикса и међућелијске компоненте епитела, попут цитокератина, *E-cadherin* –а,  $\beta$  – *catenin* – а итд <sup>(30)</sup>.

## 1.9. Етиопатогенеза стеченог холестеатома

Патогенетски механизам настанка стеченог холестеатома још увек је нејасан и предмет је великог броја контраверзних дискусија. За сада не постоји јединствена теорија која би могла да објасни појаву стеченог холестеатома и његове главне карактеристике: неконтролисана пролиферација, измењена диференцијација, инвазија, миграција, агресивност и рецидивизам холестеатома <sup>(38)</sup>.

Локални морфолошки предиспонирајући фактори који погодоју настанку холестеатома су:

1. Инфламаторни процес у слuzници горњег респираторног пута. У дечјој популацију због близине горњег спрата ждрела и средњег ува, односно кратке и широке Еустахијеве тубе, могуће су рецидивантне инфекције средњег ува у склопу респираторне инфекције горњег респираторног тракта. Инфекција је могући тригер стварања стеченог холестеатома <sup>(38)</sup>.

2. Негативан притисак у средњем уву. Притисак ваздуха у средњем уву зависи од допремања гаса, кисеоника и азота кроз Еустахијеву тубу с једне стране и са друге дифузија угљен диоксида из крвних судова средњег ува <sup>(39)</sup>. Кисеоник и азот се допремају кроз Еустахијеву тубу у антеро-инфериорни, а затим и у постеро-супериорни део средњег ува кроз предњи и задњи тимпанични истмус <sup>(40)</sup>. Комплетна вентилација средњег ува се обавља кроз аतिकотимпаничну дијафрагму која дели средње уво на антеро-инфериорни (мезо, хипо и протимпанум) и постеро-супериорни део (атик, адитус ад антрум, антрум и

мастоидне ћелије). Ови делови су морфолошко-функционално различити <sup>(22)</sup>. У првом је трепасти псеудостратификовани респираторни епител а у другом једноредни цилиндрични, нетрепасти епител, практично минимално васкуларизован па је дистрибуција угљен диоксида, која се одвија дифузијом из крвних судова минимална. Посебно се изучава утицај физичких фактора средњег ува спољашњег слушног ходника (ваздушни притисак и влажност нпр.) на активирање интрацелуларних биохемијских процеса у кератиноцитима <sup>(41)</sup>.

3. Атрофија ламине проприје бубне опне. Никада се атрофија ламине проприје бубне опне не јавља као изолован процес већ је у спрези са негативним притиском у средњем уву која истеже бубну опну и доводи до пуцања бисулфидних мостова колагена од које је изграђена ламина проприја биохемијски објашњено или доводи до губитка вискоеластичних својстава ламине проприје биофизички објашњено <sup>(41)</sup>.

4. Поремећај механизма самочишћења плочасто слојевитог епитела бубне опне. У нормалним условима постоје центрифугално кретање површинског слоја епитела бубне опне при чишћењу мртвих кератинских наслага из спољашњег слушног ходника, као и центрипетална миграција епитела преко слободне ивице руптуриране бубне опне током растања бубне опне. Ови контактом дириговани феномени миграције плочасто-слојевитог епитела објашњени од стране *Weiss*-а су поремећени код појаве ретракционог цепа тако да долази до акумулације кератина у њима или долази до пролиферације или чак имиграције епитела унутар средњег ува <sup>(38)</sup>.

5. Присуство страног епитела у средњем уву (ма како доспео ту), доводи до интеракције са околном мукозом. Трансформација од ретракционог цепа у холестеатом се догоди када се ретракциони цеп фиксира за структуре унутар средњег ува (слика 2). Затим започињу процеси ерозије оскуларног ланца и околних коштаног зида средњег ува, а локални инфламаторни или инфективни агенс у акумулираном кератину доводи до гранулационе реакције епитела, понекад и стварања полипа. Локална иритација је вероватно окидач да се у дну коштаног спољашњег слушног ходника пролиферацијом кератиноцита из ретракционог цепа развије холестеатом <sup>(38)</sup>.

Постоји 4 основне теорије настанка стеченог холестеатома заснованих на клиничким и биомолекуларним истраживањима холестеатома, а то су: 1) теорија ретракционог цепа; 2) пролиферациона теорија; 3) имиграциона теорија и 4) метапластична теорија <sup>(37, 38)</sup>.

Највећи број отолога верује у полиетиолошку основу настанка стеченог холестеатома, тако да је или ретракциони цеп прекурсор настанку холестеатома у инвагинационој теорији према *Wittmaack*-у из 1993.г. (теорија 1), или долази до хиперпролиферације базалног слоја епитела и папиларног раста према *Lange*-у из 1925.г. (теорија 2), или имиграције комадића епитела кроз већ присутну перфорирану бубну опну у средње ува према теорији *Habermann*-а из 1888.г. и *Bezold*-а из 1890.г. (теорија 3), или метапластичне трансформације мукозе средњег ува у плочасто слојевити матрикс холестеатома према теорији *Wendt*-а из 1873.г. (теорија 4) <sup>(37)</sup>. *Sudhoff* и *Tos* претпостављају да је комбинација инвагинације и пролиферације базалних ћелија одговорна за настанак стеченог холестеатома <sup>(42)</sup>.

Постоји још неколико аспеката изучавања етиопатогенезе стеченог холестеатома. Један од њих се базира на проучавању анатомских и морфолошких фактора микросредине средњег ува. Други аспект у етиопатогенези холестеатома се односи на изучавање имунолошких збивања и интрацелуларних механизма сигнализације у различитим ћелијским фазама раста кератиноцита, као што су пролиферација, диференцијација, кератинизација и апоптоза <sup>(43, 44, 45)</sup>.

Према овим аспектима, најприхватљивији модел настанка стеченог холестеатома везује се микросредину у непосредној близини бубне опне, регију тимпаничног анулуса. За настанак стеченог холестеатома неопходан је синергизам предиспонирајућих фактора, какви су негативан притисак у средњем ува, дисфункција Еустахијеве тубе и појава ретракционог цепа у једном делу бубне опне, на прелазу коже спољашњег слушног ходника у бубну опну или ретко у самој кожи спољашњег слушног ходника. Застој десквамираног кератина и нагомилавање дебриса доводи до поремећаја чишћења перути и церумена у ретракционом цепу <sup>(46)</sup>. Раст ретракционог цепа са кератинским наслагама, смањује пнеуматски простор средњег ува и појачава негативан притисак. Тај почетни раст стеченог холестеатома траје дуго и без сензација. Локална инфекција у ретракционом цепу иницира активацију и имиграцију имуних ћелија, нпр. Лангерхансових ћелија, Т лимфоцита, макрофага итд. и доводи до неспецифичног имуног одговора у микросредини средњег ува. Поновљене инфекције средњег ува преко бактеријских ензима доводе до прекида заштитне липидне мембране епитела ретракционог цепа <sup>(29)</sup>. Бактеријски антигени стимулус, микробни биофилм или фрагменти кератинског дебриса активирају

Лангерхансове ћелије и стимулишу њихову миграцију у лимфоидно ткиво <sup>(47, 38)</sup>. Лангерхансове ћелије се оспособљавају за хватање и неутрализацију антигена кроз сазревање у околним лимфним чворовима, где стимулишу пролиферацију и диференцијацију наивних Т лимфоцита у ефекторске Т лимфоците. Ефекторски Т лимфоцити мигрирају у средње уво, на место локалне инфекције, где учествују у локалном имуном одговору <sup>(48)</sup>. CD8 Т лимфоцити су цитотоксични ефекторски Т лимфоцити који у микросредини средњег ува препознају стране антигене у склопу МНС молекуле I класе и врше цитолizu ћелија мета. Ћелије мете су најчешће инфициране интрацелуларним микроорганизмима, а могу бити и сопствене имуне ћелије у којима су присутни страни антигени. Улога цитотоксичних CD8 Т лимфоцита међутим, није најважнија у имуногенези холестеатома. Кључну улогу у започињању локалног имуног одговора имају CD4 Т лимфоцити. Ефекторски CD4 Т лимфоцити су помоћнички Т лимфоцити и могу бити Th1 и Th2 типа. Ефекторски CD4 Т лимфоцити продукују бројне цитокине, као што су IFN- $\gamma$  (интерферон гама), TNF- $\alpha$  (тумор некротишући фактор алфа) интерлеукине IL-3, IL-6 итд. IFN- $\gamma$  је најпотентнији активатор макрофага који затим постају активније антиген презентујуће ћелије и повећавају продукцију проинфламаторних цитокина, кисеоничних радикала и протеолитичких ензима. IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  заједно утичу на кератиноците да испољавају интерцелуларне адхезионе молекуле и МНС молекуле II класе, што омогућава миграцију ефекторских Т лимфоцита и Лангерхансових ћелија у епител <sup>(38)</sup>. Кератиноцити затим буду лако експримовани бактеријским и другим антигенима обрађених од имуних ћелија, што индукује повећану кератиноцитну пролиферацију и диференцијацију, а поремећену матурацију и продужену апоптозу кератиноцита. Секретацијом цитокина кератиноцити имају аутокрино дејство на једној страни, а паракрино дејству у интеракцији са фибробластима у периматриксу на другој страни. Када се активирају остеокласти и остеолитички ензими развој стеченог холестеотома постаје агресиван <sup>(30, 37)</sup>.

Следећи аспекти изучавања етиопатогенезе стеченог холестеатома су имунобиохемијски, генетски итд. Скорија биомолекуларна истраживања настанак холестеатома објашњавају неконтролисано пролиферацијом епитела генетским или епигенетским променама уз утицај спољњег фактора који индукују прекомеран имунолошки одговор домаћина и појаву инфламаторног или инфективног процеса. Потенцијална генска алтерација у



холестеатому се поткрепљује прекомерном експресијом рецептора епидермалног фактора раста (*epidermal growth factor receptor* – EGFR) и фактора трансформације раста (*transforming growth factor* – TGF), као и појавом анеуплодије хромозома 8 са алтерацијом прото-онкогена *c-myc*, за који се везује пролиферативна и агресивна природа холестеатома<sup>(49)</sup>. Анеусомија хромозома 7 и 17 такође игра улогу у прекомерном расту и коштаном деструкцији холестеатома<sup>(50)</sup>. Сматра се да је генетска нестабилност одговорна за дисрегулацију интерцелуларних протеина између кератиноцита у холестеатому, какви су *E-cadherin* и *Connexin 26*<sup>(51, 52)</sup>. *Connexin 26* (такође познат као трансмембрански протеин *gap junction beta-2 GJB2*, кодиран са GJB2 геном) је пронађен у кохлеи и кожи. Мутација GJB2 гена је узрок конгениталне несиндромске глувоће и хиперкератотичних обољења коже<sup>(53)</sup>. *Choung* и сарадници су претпоставили да мутација GJB2 гена не доводи само до поремећаја у експресији *Connexin 26* у холестеатому у односу на нормалну ретроаурикуларну или кожу спољашњег слушног ходника, већ и до поремећеног развоја холестеатома који прати агресивност и остеодеструкција холестеатома<sup>(52)</sup>. *James* и сарадници су испитујући повезаност мутације GJB2 гена код холестеатома са коштаном деструкцијом у педијатријској популацији, пронашли само у 14% мутације GJB2 гена код оперисаних холестатома, што не подржава теорију генске нестабилности<sup>(54)</sup>.

Епигенетска регулација у холестеатому је највише истраживана кроз некодиране мале молекуле рибонуклеинске киселине (*microRNA*) који се састоје од 22-24 нуклеотида а имају улогу у одржавању баланса између пролиферације и апоптозе кератиноцита током развоја холестеатома<sup>(55)</sup>. Такође, интеракција између кератиноцита у матриксу и фибробласта у периматриксу игра важну улогу у ткивној хомеостазу холестеатома. Ова интеракција се одвија аутокриним и паракриним сигнаlima. Кератиноцити ослобађају проинфламаторне цитокине, као што су паратироид хормон везујући протеин (PTHrP), интерлеукини IL-1a, IL-1b, IL-6 и IL-8, који су одговорни за остеодеструкцију холестеатома<sup>(56, 7, 10)</sup>. Фибробластни цитокини, као што су фактор раста кератиноцита (KGF), епидермални фактор раста (EGF), тумор некротишући фактор алфа (TNF- $\alpha$ ) итд. индукују диференцијацију, пролиферацију и миграцију кератиноцита у матриксу<sup>(57)</sup>. Прогресиван развој холестеатома се доводи у везу са прекомерном имуном реакцијом домаћина на инфламацију, што је иначе карактеристика процеса зарастања ране<sup>(58)</sup>. Урођени имуни одговор домаћина је заштита од претеће инфекције, за разлику од прекомерног имуног

одговора домаћина који је штетан и доприноси агресивности холестеатома. Раст и развој холестеатома се не без разлога, доводи у везу са процесом зарастања ране. Процес зарастања ране представља серију међусобно зависних и пажљиво регулисаних процеса са циљем поновног успостављања анатомског континуитета имунолошке баријере и синтезе новоформираног фиброзног ткива. Процес зарастања ране пролази кроз стадијуме: резолуције (ремоделирања колагена и крвних судова), пролиферације (реепителизација, ангиогенеза и фиброгенеза), инфламације (учествују полиморфонуклеари, макрофаги и лимфоцити) и хемостазе. Хипоксија у рани иницира ангиогенезу, а пролиферација фибробласта је одговорна за синтезу екстрацелуларног матрикса. Услов за добро зарастање ране је да нема тензије ткива. Управо у средњем уву због предиспонирајућих фактора појаве холестеатома, долази до тензије ретракционог џепа и поремећене реституције епитела <sup>(59)</sup>. С друге стране, описани су случајеви реституције ретракционих џепова бубне опне, без прогресије ка развоју стеченог холестеатома. Могуће је да је до „сомоизлечења“ долази нестанком предиспонирајућих фактора настанка холестеатома.

Током инфламације различите ћелије у матриксу и периматриксу холестеатома (нпр. леукоцити, моноцити, макрофаги итд.) ослобађају ангиогене факторе (васкуларни ендотелни фактор раста, EGF, TGF и циклооксигеназу 2 – COX2) и доводе до ангиогенезе периматрикса која је кључна за пролиферацију и миграцију кератиноцита матрикса холестеатома у средњем уву <sup>(60)</sup>. Исте ћелије су одговорне за синтезу и ослобађање протеолитичких ензима, каква је матрикс металопротеиназа (MMPs), одговорна за агресивност и остеодеструкцију у холестеатому <sup>(61)</sup>. Многи отолози се слажу да присуство бактеријског биофилма код антибиотик резистентних инфекција средњег ува, игра главну улогу у етиопатогенези холестеатома и стимулише агресивност холестеатома <sup>(62, 63)</sup>. Продукција бактеријског биофилма је детерминисана присуством резистентних сојева бактерија које трошећи кисеоник константно праве атмосферу оксидативног стреса односно уз дизбаланс између повећане потрошње кисеоника и смањене продукције антиоксиданата од стране преостале здраве слузнице средњег ува <sup>(64, 63)</sup>. Липополисахаридни биофилм којег формирају бактерије нпр. *Pseudomonas auriginosa* стимулише пролиферацију кератиноцита у холестеатому <sup>(63)</sup>. Присуство биофилма спречава активацију терминалне диференцијације кератиноцита, а у развоју холестеатома уводи продужену пролиферацију, миграцију и инвазију.

### 1.10. Дијагноза стеченог холестеатома

Дијагноза стеченог холестеатома почиње узимањем анамнестичких података од пацијента. Главни симптом је безболно цурење фетидног секрета из оболелог ува које не пролази на топикално лечење антибитским капима за уво, нити применом системских антибиотика ординираним по брису ува. Клиничку слику стеченог холестеатома карактеришу такође слабљење слуха, запушеност ува и шум у уву. Појава других симптома као што су болови у уву или главобоље у слепоочној регији са или без повишене темпеартуре, вртоглавице и поремећај равнотеже могу указивати на отогену компликацију. Клинички преглед подразумева комплетан оториноларинголошки преглед са посебним освртом на отоскопирање и нарочито отомикроскопирање. Класична отоскопска слика стеченог холестеатома је ивична перфорација бубне опне са љуспицама холестеатома који из бубне дупље вире кроз перфорацију на бубној опни или је чак затварају крустом (слика 1).



**Слика 1.** Отомикроскопска слика атик холестеатома са крустом која затвара атик перфорацију (црвена стрелица). Парс тенза бубне опне је уредног изгледа, а холестеатом се из атика кроз *von Troeltsch* – ов цеп спушта у мезотимпанум (жута стрелица).

Неретко се могу видети полип или гранулације на бубној опни, као и гнојни садржај непријатног мириса <sup>(65)</sup>. Отоендоскопија има своје место у преоперативном и постоперативном праћењу налаза стеченог холестеатома. Отоендоскопија је нарочито добра за праћење ретракционих цепова бубне опне, који су прекурсори настанка стеченог холестеатома (слика 2). Треба благовремено извршити класификацију ретракционог цепа бубне опне и ако ретракциони цеп уђе у IV завршни стадијум развоја, уво треба оперисати и не чекати на појаву холестеатома <sup>(65, 46)</sup>.



**Слика 2.** Атик ретракциони цеп IV стадијума. Атрофична парс флакцида бубне опне је налегла на коштане структуре кавума тимпани (црвена стрелица). Постоји велика вероватноћа за настанак холестеатома. Жуте стрелице показују узурацију латералног зида атика са присутним биофилмом по ободу. Парс тенза бубне опне је цела са кречном инкрустацијом у задњим квадрантима.

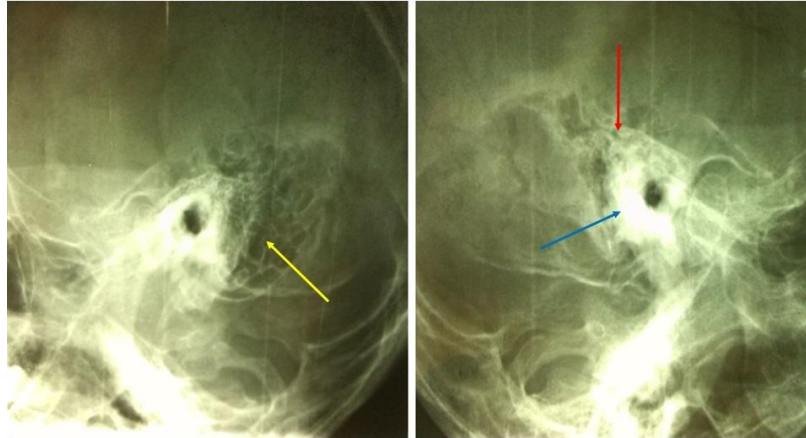
Отоендоскопија пружа могућност прављења индивидуалног терапијског плана за сваког пацијента и ранијег дијагностиковања стеченог холестеатома. Дифузни холестеатоми (холохолестеатоми) који захватају сва три спрата кавума тимпани су у поодмаклом

стадијуму развоја холестеатомског процеса и пропуштају могућност прављења терапијског плана, већ се одмах подвргавају операцији (слика 3).



**Слика 3.** Дифузни холестеатом средњег ува. Постоји потпуни дефект бубне опне, са непознатљивим структурама кавума тимпани, који је испуњен гнојним садржајем и влажним кератинским детритусом. Стрелице показују остатке слушних кошчица.

Микробиолошком анализом бриса секрета из ува изолују се појединачна или мешовита флора, аеробних и анаеробних, мање или више резистентних сојева бактерија: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus species*, *Proteus mirabilis*, *Peptococcus*, *Bacteroides* итд. затим гљивичне инфекције, најчешће рода *Aspergillus* <sup>(66)</sup>. Испитивањем слуха добија се мање или више изражена проводна или мешовита редукција слуха у зависности од проширености и деструктивности холестеатомског процеса. Радиолошка испитивања темпоралне кости су неопхода због коштанога разарања услед присуства холестеатома. Rtg мастоида по *Schuller*-у углавном даје слику склеротичног мастоидног наставка (слика 4), диплоичног или целуларног и приказује синодурални угао, што је довољна радиолошка оријентација за отохирурга <sup>(67)</sup>.



**Слика 4.** Rtg мастоида по *Schuller*-у показује лево добро пнеуматизован мастоидни наставак (жута стрелица), а десно склеротичан (плава стрелица) са обележеним синодуралним углом (црвена стрелица).

Компјутеризована томографија (СТ) темпоралних костију и/или магнетна резонанца (MR) главе су неопходни код рецидива стеченог холестеатома или код сумње на отогену компликацију. Пошто савремена технологија диктира медицински развој, светски трендови се мењају, па се данас примарни холестеатоми преоперативно подвргавају дифузној пондерисаној MR или скенеру високе резолуције (*high resolution computed tomographi* – HRCT, слика 5) <sup>(68, 69)</sup>.



**Слика 5.** HRCT темпоралне кости – коронарни пресек; жута стрелица показује присуство холестеатома у латералном делу епитимпанума.

Стечени холестеатом је један од могућих узрока отегених егзокранијалних и ендокранијалних компликација. Егзокранијалне компликације су: *mastoiditis*, *petrositis*, *osteomyelitis ossis temporalis*, *paralysis n. facialis* и *labyrinthitis*, док су ендокранијалне компликације: *abscessus extraduralis*, *abscessus subduralis*, *meningitis*, *abscessus cerebri*, *abscessus cerebelli* и *trombohebitis sinus sigmoidei* <sup>(70)</sup>.

### 1.11. Хируршко лечење стеченог холестеатома

Лечење стеченог холестеатома је искључиво хируршко. Циљеви хируршког лечења су потпуно одстрањење холестеатома, презервација слуха и минимализовање појаве рецидива болести <sup>(27)</sup>. Пошто нема алтернативе хируршком лечењу холестеатома, саветује се што пре операција, иако су индикације за ургентну операцију ретке и везану су за појаву егзокранијалне и/или ендокранијалне компликације болести <sup>(70, 71)</sup>. Пацијентима са холестеатомом код којих је због коморбидитета контраиндикована општа анестезија и одложено хируршко лечење, саветује се чување болесног ува од влажења и медикаментозно купирање инфекције до термина операције. Предуслов за успешну хирургију, с обзиром на скућеност оперативног поља је добро познавање анатомије и физиологије средњег ува.

Крајем XIX века отпочела је ера хируршког лечења холестеатома средњег ува. *Hermann Schwartze* и *Adolf Eysell* су још 1873.г. отпочели еру отохирургије са мастоидектомијама због ретроаурикуларног абсцеса, а затим и због хроничних гнојних упала ува са холестеатомом <sup>(3)</sup>. *Heath* и *Bryant* су почев од 1906.године радили мастоидектомије са приступом иза и испред ушке који се и данас примењују <sup>(4)</sup>. До половине XX века мастоидектомије су унапређене у тимпанопластике, односно оперативно поље је проширено на бубну опну и бубну дупљу. *House* и *Wullstein* су 1950.године су отворили еру микроскопске хирургије средњег ува уз коришћење електричне фрезе <sup>(4)</sup>. Од тада до данас, постоји убрзани напредак у операцијама стеченог холестеатома који покушавају да прате софистицирану технологију (савремени микроскопски, отоендоскопија, комјутеризована томографија високе резолуције, магнетна резонанца). Примењују се

различити типови тимпанопластике у зависности од екстензивности холестеатомског процеса. Велик број операција средњег ува изнедрио је велики број класификација тимпанопластика према аутору (*Wullstein, Bondy, Paparella, Padovan, Fish, Tos...*) које су се мењале напредовањем хируршких техника<sup>(3, 4)</sup>. Савремени приступ у операцији стеченог холестеатома подразумева комбиновани приступ, трансмастоидни и трансканални уз интраоперативну отоендоскопију. За ерадикацију холестеатома из неприступачних шпагова, понекад је потребно привремено уклонити задњи коштани зид спољашњег слушног канала, тзв. „*mobile bridge*“ техником и/или уклонити латерални зид епитимпанума, а затим направити реконструкцију<sup>(72, 73, 74)</sup>. Исто треба учинити и са осикларним ланцем. Често је холестеатомским процесом прекинут ланац слушних кошчица, чији се делови могу употребити за реконструкцију - осиклопластику и успостављање мобилности осикларног ланца. Ако је осикларни ланац инфилтрисан матриksom холестеатома, онда се те слушне кошчице одстрањују, не могу се употребити за реконструкцију, већ се користе парцијалне или тоталне протезе од компатибилних материјала. Могуће је такође употребити аурикуларну или трагусну хрскавицу, коштани графт кортекса мастоида, перихондријум, периост, венску адвентицију, масно ткиво или фасцију темпоралног мишића за реконструкцију разних дефеката у средњем ува, укључујући и дефект бубне опне<sup>(75, 76, 77)</sup>.

Хируршки ризици тимпанопластике постоје и огледају се у оштећењу слуха, појави рецидива холестеатома што укључује отореју, рекурентне инфекције, а ређе су појаве поремећаја чула укуса због лезије хорде тимпани, лезија фацијалног нерва, тинитус, вртоглавица и поремећај равнотеже. Рецидиви стеченог холестеатома средњег ува јављају се у 20 - 50% случајева у десетогодишњем периоду праћења пацијената и захтевају реоперацију ува<sup>(25)</sup>. Код случајева стеченог холестеатома са отогеном ендокранијалном компликацијом изводи се радикална тимпаномастоидектомија<sup>(71)</sup>. Ова операција подразумева екстезијацију свих пнеуматских простора средњег ува, вађење слушних кошчица, одстрањење бубне опне или њених остатака и затварање Еустахијеве тубе, односно сепарацију средњег ува од епифаринкса. Радикална тимпаномастоидектомија се ради код отогених компликација или много пута поновљених операција ува, а као колатералну штету има тешко оштећење слуха и велику нефункционалну шупљину у темпоралној кости коју треба редовно чистити на 3 - 6 месеци<sup>(78, 79)</sup>.



## 2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

### *Циљеви истраживања:*

- Испитати експресију PCNA, Ki-67 и COX-2 и присуство CD4 и CD8 T лимфоцита у најмање три хистолошка препарата по оперисаном пацијанту и то: препарат стеченог холестеатома (hol), препарат коже спољашњег слушног ходника (ssh) и препарат ретроаурикуларне коже (га)
- Одредити индекс кератинизације, индекс запаљењског инфилтрата и индекс пролиферације колагена у стеченом холестеатому код оперисаних болесника.
- Испитати улогу ћелијске имуности преко семиквантитативне процене CD4 и CD8 T лимфоцита у развоју стеченог холестеатома.
- Испитати повезаност степена експресије PCNA, Ki-67 и COX-2 и присуства CD4 и CD8 T лимфоцита са хистолошким и клиничким карактеристикама стеченог холестеатома.

### *Хипотезе истраживања:*

- Експресија PCNA, Ki-67 и COX-2 и присуство CD4 и CD8 T лимфоцита је највеће у стеченом холестеатому, затим у кожи спољашњег слушног ходника, а најмање је у ретроаурикуларној кожи.
- Индекс кератинизације је већи у групама холестеатома са мањом коштаном деструкцијом, са мањом екстензивношћу холестеатомског процеса и одсуством инфекције.
- Индекс запаљенског инфилтрата и индекс пролиферације колагена је већи у групама холестеатома са већом коштаном деструкцијом, са већом екстензивношћу холестеатомског процеса и са присутном инфекцијом.
- Индекс кератинизације холестеатома је у негативној корелацији са експресијом PCNA, Ki-67 и COX-2 и присуством CD4 и CD8 T лимфоцита

- Индекс запаљенског инфилтрата и индекс пролиферације колагена су у позитивној корелацији са експресијом PCNA, Ki-67 и COX-2 и присуством CD4 и CD8 Т лимфоцита
- Експресија PCNA, Ki-67 и COX-2 и присуство CD4 и CD8 Т лимфоцита је израженије у стеченим холестеатомима са тежом клиничком сликом, односно у групама холестеатома са већом коштаном деструкцијом, са већом екстензивношћу холестеатомског процеса и присутном инфекцијом.

### **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

#### **3.1. Дизајн студије**

Истраживања је дизајнирано као проспективна, кохортна, клиничка опсервациона студија.

#### **3.2. Испитаници**

Истраживањем је обухваћено 50 пацијената доба 10-77 година оба пола, који су оперисани под дијагнозом стеченог холестеатома средњег ува. Истраживање је спроведено у периоду од 2012 - 2015. године у ОРЛ Клиници ВМА Београд и Институту за патологију ВМА Београд, према одредбама Декларација из Хелсинкија, а на основу одобрења Етичког одбора ВМА Београд од 01.04.2012. године по акту Начелника пов. бр. 3232-1. Испитивани пацијенти су са територије Републике Србије, Републике Српске и Републике Црне Горе, код којих је у циљу лечења стеченог холестеатома средњег ува, урађен неки од типова операције средњег ува.

Основни критеријум за укључење испитаника у студију био је дијагноза стеченог холестеатома средњег ува. Критеријум за искључивање испитаника из студије су биле удружене болести уз стечени холестеатом средњег ува, какве су малигне неоплазме биле којег порекла и хроничне болести коже спољашњег слушног ходника и/или периаурикаларне регије типа екцема, псоријазе, лупуса итд.

Сваки од оперисаних пацијената био је упознат са учешћем у докторској студији и потписао је сагласност за оперативно лечење и узорковање ткива за наведено медицинско истраживање.

#### **3.3. Клиничка испитивања**

Дијагноза стеченог холестеатома средњег ува била је постављена на основу анамнезе, клиничке слике, основног физикалног прегледа (отомикроскопирања и објективног ОРЛ прегледа), отоендоскопије, тестирања слуха и равнотеже (аудиовестибулометрије) и радиолошких претрага (Rtg мастоида по *Schuller*-и,

комјутеризоване томографије високе резолуције (HRCT) темпоралних костију и магнетне резонанце (MR) главе код ендокранијалних и егзокранијалних отогених компликација). Анамнестички подаци су упућивали на повремено цурење фетидног секрета из оболелог ува, слабљење слуха са шумом или без шума у уву. Свако појављивање других симптома као што су: болови у уву, главобоље, вртоглавице, повишена температура и др. указивали су на могоћу отогену компликацију. Отомикроскопским прегледом је идентификована ивична перфорација бубне опне, са љуспицама холестеатома који се налазе у кавума тимпани и преливају у спољашњи слушни ходник, док је део бубне опне ретрахован или је цела бубна опна ателектатична. Неретко је перфорација на бубној опни затворена крустом, па када се она скине, провире холестеатомске перле из ретракционог цепа у атику или задње-горњег квадранта бубне опне (слика 1). Често су уз холестеатом нађене гранулације или полипи који крваре, па је секреција из ува била сукрвичава код појединих испитаника. Отечен и спуштен задње-горњи зид спољашњег слушног ходника или оток иза ува, уз отоскопки налаз холестеатомског дебриса, говорило је у прилогу настанка мастоидитиса. Код свих испитаника је узиман брис ува преоперативно а ако је он био негативан на присуство бактерија, брис је поново узиман интраоперативно. Прегледом слуха најчешће је нађено кондуктивно или мешеовито оштећење слуха различитог степена у зависности од проширености холестеатома. Маса холестеатомског детритуса у бубној дупљи је одличан проводник звука, тако да је у појединим случајевима била минимална редуцкија слуха на оболелом уву. Код испитаника са вртоглавицом спроводили смо вестибулометријска испитивања: ротаторни тест и калорички тест топлим и хладним ваздухом због сумње на фистулу лабиринта. Позитиван тест фистуле смо верификовали *Valsalva* маневром или микроаспирацијом болесног ува. Тешко оштећење слуха код холестеатома уз арефлексију или хипофункцију лабиринта у калоричком и ротаторном тесту, постављало је сумњу на лабиринтитис, а уз позитиван *Romberg* и/или *Unterberger* тест и на церебеларни абсцес. Позитивни менингеални знаци код холестеатома и поремећај свести, нарочито када су они удружени са престанком супурације из ува, постављали су сумњу на отогени менингитис. Rtg мастоида по *Shuller*-у смо обавезно радили код свих испитаника, HRCT темпоралних костију код рецидива холестеатома, а код сумње на отогену компликацију HRCT темпоралних костију и MR главе.

### 3.4. Узорковање материјала

- 1) Узимање узорака. Током оперативног захвата узимана су најмање три ткивна препарата величине од 3-5mm и то: препарат холестеатома, препарат коже спољашњег слушног ходника и препарат ретроаурикуларне коже.
- 2) Фиксација, дехидратација, просветљавање и прожимање у парафину ткивних узорака помоћу апарата *Leica ASP 300*. Фиксација у 4% пуферисаном формалину, или смрзавањем у течном азоту и фиксација у ацетону. Смрзнуто ткиво се до сечења на криотому чува на  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- 3) Сечење парафинских калупа на аутоматском ротационом микротому *LKB Historange* на резове дебљине 4 $\mu$ , а смрзнутог ткива на криотому дебљине 5-7 $\mu$ , а затим бојење хематоксилин – еозином (HE бојење).
- 4) Монтирање ткивних исечака на стаклене предметне плочице. Пресеци који су користе за имунохистохемију се наносе затим на Суперфрост + предметна стакла.
- 5) Депарафинизација и дехидратација. Парафински исечци ткива се депарафинишу ксилолом, третирају серијом разблажења алкохола (70%, 95% и 100% етанола), а затим испирају у води.

### 3.5. Хистопатолошка испитивања

Ткивни пресеци који се боје са хематоксилин-еозином су анализирани под светлосним микроскопом. Препарати коже спољашњег слушног ходника и препарати ретроаурикуларне коже су такође испитивани хистопатолошки и имунохистохемијски. Квалитативна и квантитативна патохистолошка анализа холестеатома је обављана у матриксу и периматриксу сваког холестеатома, док аморфни садржај није био предмет нашег истраживања, осим у оном делу стратум корнеума матрикса – хиперкератотичан и десквамирајући слој за који су везане мање или веће насlage кератина. У матриксу холестеатома су анализирани епителне ћелије (кератиноцити), њихов број, изглед, дистрибуција по слојевима, дебљина епителног слоја и карактеристике кератинских наслага. У матриксу холестеатома су анализирани и друге некератотичне ћелије, углавном

лимфоцити. У периматриксу холестеатома испитиване су морфолошке карактеристике, грађа и дебљина и дистрибуција стромалних ћелија и ћелијских инфилтрата, затим промене на крвним судовима, као и карактеристике екстраћелијског матрикса, а посебно пролиферација колагена <sup>(80)</sup>.

Семиквантитативном методом је вршени степеновање појединих хистопатолошких карактеристика холестеатома као што су наслага кератина, запаљенски ћелијски инфилтрат и присуство најзаступљенијег протеина екстрацелуларног матрикса у периматриксу, односно колагена <sup>(80, 81, 82)</sup>. Бодовање промена је утврђено након што је израчунаван одговарајући индекс <sup>(82)</sup>. Индекс кератинизације је процењен на следећи начин:

0 = одсуство наслага кератина

1 = слабо изражене кератинске насlage

2 = умерено изражене кератинске насlage

3 = упадљиво изражене кератинске насlage

Индекс запаљенског инфилтрата је процењен на следећи начин:

0 = одсутан ћелијски инфилтрат

1 = слабо изражен ћелијски инфилтрат (просечно мање од 5 ћелија у једном видном пољу, увећање 40 x 10)

2 = умерено изражен ћелијски инфилтрат (5-20 ћелија по једном видном пољу, увећање 40 x 10)

3 = упадљиво изражен ћелијски инфилтрат (више од 20 ћелија по једном видном пољу, увећање 40 x 10)

Индекс присуства колагена је одређен *Sirius red* методом хистохемијског бојења, на следећи начин:

0 = одсуство колагена

1 = слабо изражен колаген

2 = умерено изражен колаген

3 = упадљиво изражен колаген

Резултати хистопатолошког испитивања холестеатома су приказани дескриптивно, на сликама, табеларно и графиконима.

### 3.6. Имунохистохемијско бојење парафинских исечака:

- 1) Демаскирање формалином умрежених епитопа обављано је у нашој установи кувањем ткивних пресека у 0,05 М цитратном пуферу рН 6,0 у микроталасној пећници (20 минута на 600 W). Плочнице су затим хлађене током 20 минута, а затим испиране дестилованом водом.
- 2) Блокирање активности ендогене пероксидазе. Плочнице су третиране 3% раствором водоник пероксида у току 5 минута, а затим испиране у Трис пуферу са додатком 0,5% раствора *Tween 20* (TBST пуфер).
- 3) Имунохистохемијска процедура »бојења«. Затим следи процес инкубације плочица 30 минута са одговарајућим примарним моноклонским антителима у влажној комори.
- 4) Визуализација. На плочнице су наносени *EnVision* ТМ + реагенс системи за визуализацију а затим процес испирања у TBST пуферу, после 10 - минутне инкубације плочица у раствору диаминобензидина (DAB), који је коришћен као хромоген. Након испирања у дестилованој води рађено је контрастирање *Mayer* - овим хематоксифилином и испирање плочица у текућој чесменској води. Монтирање плочица је обављано са *Faramount* - медијумом.

### 3.7. Имунохистохемијско бојење криостатских исечака

Криостатски пресеци, који су претходно фиксирани у ацетону, инкубирани су са кунићевим серумом а затим са примарним моноклонским антителима (60 минута). Након испирања у Трис пуферу, рН=7.6, на ткивне пресеке је наносено кунићево анти - мишје антитело (инкубација 30 минута), а затим АРААР комплекс (алкална фосфатаза - антиалкална фосфатаза комплекс), такође у трајању од 30 минута. Визуализација везивања рађена је са хромогеном за алкалну фосфатазу (*Fast red*). Плочнице су инкубирани 1 минут са *Mayer* -овим хематоксифилином, а затим монтиране у *Kayzer* - овом гелу.

### 3.8. Имунохистохемијска анализа

Имунохистохемијска анализа холестеатома и коже може бити квалитативна и квантитативна. Семиквантитативном имунохистохемијском анализом смо одређивали број ћелија (на целом ткивном пресеку, или посебно у матриксу или изражено у инфламаторном инфилтрату) које су испољавале одређене маркере. Број позитивних ћелија у матриксу и периматриксу је изражен у процентима у односу на укупан број свих ћелија са једром у матриксу и периматриксу и груписан у једну категорију испитаника од 0% – 100% <sup>(83, 48)</sup>. Најчешће је проценат одређиван на основу укупно избројаних 1000 нуклеисаних ћелија. Налазе смо затим поредели према клиничким (екстензивност холестеатомског процеса, коштана деструкција и присуство/одсуство инфекције) и хистопатолошким карактеристикама холестеатома (степен кератинизације, степен запаљенског инфилтрата и пролиферација екстрацелуларног матрикса) или смо поредили са налазима узорковане коже.

Имунохистохемијском методом обављали смо квалитативну анализу PCNA, Ki-67, COX-2, CD4 и CD8 Т лимфоцита, пошто је имунохистохемијска метода по својој природи примарно квалитативна метода. Експресију маркера ћелијске пролиферације и инфламације смо због поређења у различитим ткивним узорцима превели у семиквантитативне параметре <sup>(82, 83, 84)</sup>.

Постоји неколико начина квантификације обележених параметара PCNA, Ki-67, COX-2, CD4 и CD8 Т лимфоцита моноклонским антителима, тако да смо експресију PCNA, Ki-67, COX-2, CD4 и CD8 Т лимфоцита изразили:

1 = 0-25% позитивности

2 = 25-50% позитивности

3 = 50-75% позитивности

4 = 75-100% позитивности

Битан сегмент имунохистохемијске методе су контроле, које могу бити двојаке, позитивне и негативне. Позитивне контроле правили смо паралелним спровођењем имунохистохемијске процедуре на ткивним узорцима холестеатома за које смо знали да



показују висок ниво експресије анализираниог антигена. Негативне контроле представљају паралелно спровођење имунохистохемијске анализе на истим ткивним пресецима холестеатома, али уз коришћење индиферентног пуфера уместо примарног антитета, који није имао афинитет везивања за анализирание антигене.

### 3.9. Снага студије и величина узорка

Наша истраживања су била базирана на упоређивању параметара у оперисаних холестеатома подељених у неколико група од којих је најважнија подела према коштаном деструкцији на 1) холестеатоме са већом коштаном деструкцијом и 2) холестеатоме са мањом коштаном деструкцијом. На основу резултата клиничке студије, коју су спровели *Hamzei* и сарадници и наших прелиминарних испитивања експресије CD4 Т лимфоцита, приказане су средње вредности уз стандардну девијацију и то <sup>(61, 82)</sup>:

1) група холестеатома са већом коштаном деструкцијом  $99,26 \pm 53,23$  CD4 Т лимф./мм<sup>2</sup>

2) група холестеатома са мањом коштаном деструкцијом  $34,43 \pm 24,05$  CD4 Т лимф./мм<sup>2</sup>

Величина узорка у нашој студији одредили смо коришћењем Т-теста за процену величине група испитаника у програму *G-Power* 3.1.2. За жељену вероватноћу грешке првог реда ( $\alpha = 0,05$ ) и жељену снагу теста (80%) израчуната вредност броја испитаника неопходних за извођење ове студије била је најмање 21 у свакој групи, укупно 42 испитаника, односно најмање 42 пацијента која су оперисана због стеченог холестеатома средњег ува.

### 3.10. Статистичка обрада података

Клиничке карактеристике холестеатома, екстензивност, коштана деструкција и присуство/одсуство инфекције разврстаних по наведеним групама испитаника, представљена су табеларно и графиконима. Хистопатолошке карактеристике холестеатома процењена су на основу семиквантитативне анализе и након израчунавања индекса приказана су табеларно. Имунохистохемијске карактеристике холестеатома, коже

спољашњег слушног ходника и коже ретроаурикуларне регије процењена су семикавантитативном анализом такође.

У статистичкој обради, поред стандардних статистичких метода аритметичке средине, стандардне девијације користили смо *SPSS* за *Windows* верзију *PASW 18.0*, Т-тест за независне узорке и *Mann-Whitney U* тест и поредили смо са вредностима пролиферативних и инфламаторних параметара у три биоптирана подручја. *Spearman*-овом корелационом анализом одређивали смо повезаност клиничких и патохистолошких карактеристика стеченог холестеатома са пролиферативним и инфламаторним параметрима стеченог холестеатома.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Основне карактеристике испитаника

Истраживањем је обухваћено 50 испитаника доба 10-77 година, оба пола, који су оперисани под дијагнозом стеченог холестеатома средњег ува у периоду од 2012 - 2015. године. Однос пола у популацији испитаника била је у корист мушкараца (34:16). Најмлађи пацијент је имао 10 година, а најстарији 77 година. Највећи број испитаника је био средње животне доби (70% испитаника је било старосне доби 30-60 година), што је приказано и у табели 1.

Године живота испитаника	Број испитаника
10-19	3
20-29	7
30-39	14
40-49	8
50-59	13
60-69	3
70-79	2

**Табела 1. Старосна расподела испитаника**

Код 42 испитаника учињена је тимпаноластика, од којих је било свега 3 реоперације, односно ретимпаноластике. Радикална тимпаномастоидектомија је урађена код 8 испитаника, у 2 случаја због дифузног холестеатома, а у 6 случајева због рецидива холестеатома (табела2). Оперисано је укупно 9 испитаника са рецидивом холестетаома. Приближно исти број испитаника је имао атик и парс тенза холестеатом (21:17). Свега 3 испитаника је имало дифузни холестеатом (слика 3).

Стечени холестеатом	Број испитаника	Тимпано-пластика	Радикална тимпаномаст.
Атик холестеатом	21	21	0
Парс тенза холест.	17	17	0
Дифузни холест.	3	1	2
Рецидив	9	3	6
- Укупно операција	<b>50</b>	<b>42</b>	<b>8</b>

**Табела 2. Расподела испитаника према клиничкој класификацији холестеатома и типу операције**

#### **4.2. Интраоперативни налаз**

Сви испитаници су оперисани у општој ендотрахеалној анестезији комбинованом техником, уз трансмастоидни и трансканални приступом. Углавном се радило о склеротичном, слабо пнеуматизованом мастоидном процесусу, јер појави холестеатома претходи слабија аеризација пнеуматских шупљина темпоралне кости (слика 4). Налази са антепонираним сигмоидним синусом са денудацијом сигмоидног синуса и денудацијом дуре у пределеу тегмена антрума или атика су били ретки. Коштане деструкције, укључујући и прекид ланца слушних кошчица, дефектан латерални зид атика и/или задњи зид спољашњег слушног канала, деструкција мастоидних целула, дефектан коштани зид фацијалног канала и латералног полукружног канала по правилу су нађени код екстензивних холестеатома. Опсежан интраоперативни налаз стеченог холестеатома је био обавезан и код малобројних отогених компликација (табела 3). Ендокранијалне и егзокранијалне компликације стеченог холестеатома средњег ува уз тешку клиничку слику испитаника, били су индикација за радикалну тимпаномастоидектомију. Од 8 испитаника код којих је учињена операција радикална тимпаноматоидектомија, 2 случаја су била реоперације више пута рађених тимпаноластика, 2 случаја су била ревизије радикалне тимпаномастоидектомије, а 4 случаја су хитно оперисана због егзокранијалних и ендокранијалних компликација (2 пацијента су имала акутни мастоидитис, један чак

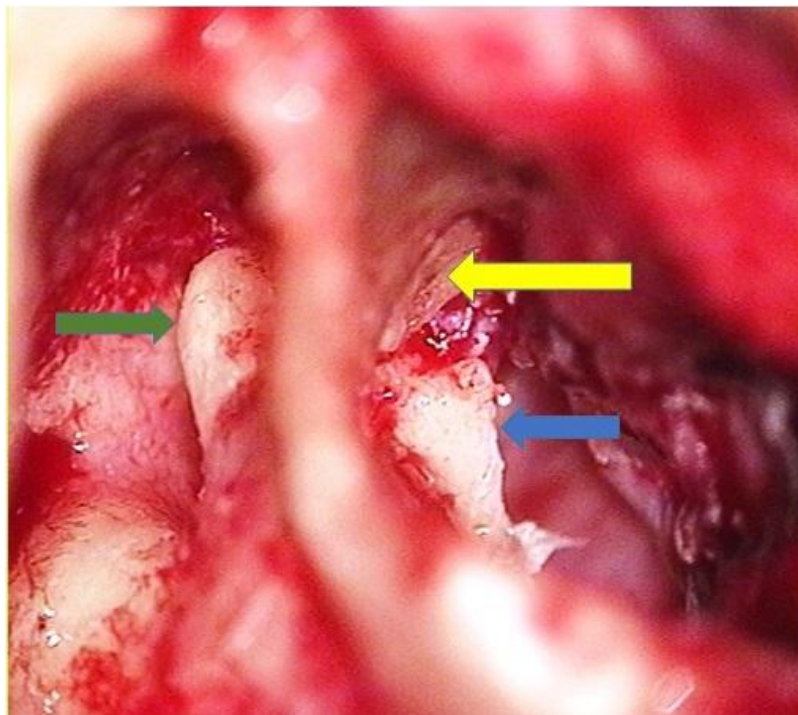
удружен са *Bezold*-овим абсцесом; један пацијент је имао лабиринтитис и један отогени менингитис). Код једног испитаника са отогеном парализом фацијалног нерва изазваном хроничном гнојном упалом ува са дифузним холестеатомом, урађена је хитна тимпаноластика са декомпресијом фацијалног нерва.

Отогене компликације	Број испитаника
Егзокранијалне:	4
- Мастоидитис	2
- Парализа фацијалног нерва	1
- Лабиринтитис	1
Ендокарнијалне:	1
- Менингитис	1

**Табела 3. Отогене компликације испитаника**

Одабир оперативне технике тимпаноластике искључиво је зависио од локалног налаза, односно проширености холестеатомског процеса. Већина тимпаноластике су урађене у једном акту са примарним циљем ерадикације холестеатома, а секундарним реконструкцијом структура средњег ува и реституцијом аудиовестибуларне функције. Други акт тимпаноластике или тзв. „*second look*“ операција је предложена код 8 испитаника у периоду од годину дана након прве операције. Ради се о пацијентима који су имали екстензивне холестеатоме удружене са полипозно измењеном слузницом средњег ува и опструисаном Еустахијевом тубом или за случајеве са незадовољавајућим постоперативним слухом. Присуство холестеатома у неприступачним шпаговима средњег ува, у рецесусу фацијалиса, синусу тимпани око денудираног фацијалног канала итд. захтевало је отклањање задњег зида спољашњег слушног канала и операције по типу „*mobile bridge*“ или „*wall down*“ тимпаноластике. Само један пацијент је преоперативно био са клиничком сликом парализе фацијалног нерва, док је интраоперативно било 6 пацијената са лезијом коштаног канала фацијалног нерва у тимпаналном току, а један чак са огољеним фацијалним нервом као код декомпресије личног живца, а без клиничких

знакова оштећења фацијалног нерва пре- и постоперативно. За реконструкцију оштећених коштаних структура, латералног зида атика, делове задњег зида спољашњег слушног канала, огољеног зида сигмоидног синуса или дуре, као и оскуларног ланца користили смо аутографт од хрскавице трагуса, аурикуларне хрскавице или кортекса мастоидног наставка као и делове слушних кошчица захваћене холестеатомским процесом (слика 6).



**Слика 6.** Интраоперативни налаз. Реконструкција латералног зида атика уз помоћ коштане ламеле од кортекса мастоидног наставка (жута стрелица). Слушне кошчице су захваћене холестеатомом, малеус (плава стрелица) и инкус (зелена стрелица).

За реконструкцију бубне опне користили смо фасцију темпоралног мишића, перихондријум трагусне хрскавице, периост са мастоидне кости и трагусну или аурикуларну хрскавицу (слика 7).



**Слика 7.** Постоперативни налаз. Већа слика приказује отомикроскопски налаз са реконструкцијом дела бубне опне и латералног зида атика уз помоћ аурикуларне хрскавице. Мања слика приказује употребљени алогографт – аурикуларну хрскавицу.

Код ниједног испитаника за реконструкцију бубне опне нисмо користили вештачке материјале. За реконструкцију оскуларног ланца користили смо аутографт (делове слушних кошчица, кортекс мастоида или аурикуларну хрскавицу смо употребили за 34 осиклопластике), код 8 испитаника употребили смо импланте за средње уво (3 парцијалне и 5 тоталних титанијумских оскуларних протеза), док је 11 испитаника било са очуваним оскуларним ланцем. Код 4 испитаника смо пронашли фистулу на латералном полукружном каналићу, од којих је један имао лабиринтитис. Презервацију фистуле на латералном полукружном каналићу смо учинили уз помоћ коштаног фрагмента кортекса мастоидног наставка и комадића фасције темпоралног мишића. Два пацијента су претходно оперисана од бластрауматских повреда ува, од који је само један имао хоризонталне фрактурне линије у коштаном делу звуковода и тегмену кавума тимпани. Интраоперативно је узиман брис ува само код испитаника који нису имали преоперативно урађен брис ува или је преоперативни налаз бриса био негативан. Више препарата

холестеатома, увек бирајући матрикс са коштаних зидова, неколико исечака коже коштаног дела спољашњег слушног ходника и по један исечак коже ретроарикуларне регије са места реза коже испитаника су послати као засебни препарати на патохистолошку верификацију.

#### **4.3. Испитивање клиничких карактеристика холестеатома**

Клиничке карактеристике холестеатома се одређују на основу отомикроскопског налаза, комплетног оториноларинголошког прегледа и дијагностичких процедура и на основу интраоперативног налаза <sup>(65)</sup>. Детаљним анализирањем интраоперативних налаза свих оперисаних испитаника са стеченим холестеатомом средњег ува најбоље се одређују клиничке карактеристике битне у развоја холестеатомског процеса. Многобројна оштећења манифестована на бубној опни и на слузници средњег ува била су мање или више заједничка за све испитанике. Оно што је правило разлику између испитаника у клиничком налазу су оштећења на осикуларном ланцу и на зидовима пнеуматских простора темпоралне кости типа деструкције коштаних структура и последичног оштећења слуха и равнотеже. Притисак холестеатомских маса се најпре реперкутује на инкудостапедијалном зглобу, тако да је прекид осикуларног ланца и најчешћа осикуларна деструкција на нивоу дугог крака инкуса (36 од 50 испитаника, односно 72%), затим супраструктура степеса (23 од 50 испитаника, односно 46%) док је у мањем проценту остеодеструкцијом захваћено све три слушне кошчице (11 од 50 испитаника, односно 22%). У 6 испитаника верификовали смо оштећење коштаног канала фацијалног нерва, а у 5 испитаника је било са отвореним хоризонталним полукружним каналићем. Само 1 од 6 дехисцентних фацијалних канала (17%) је имао знаке периферне парализе фацијалиса, а 1 од 5 деструисаних коштаних хоризонталних полукружних каналића (20%) је имао лезију мембранозног полукружног каналића, са клиничком сликом лабиринтитиса.

Такође екстензивност холестеатомског процеса је директно утицала на тежину клиничке слике. Што опсежнији интраоперативни налаз, са учесталим инфекцијама и супурацијама ува, по правило је значио и већу коштану деструкцију и тежу клиничку слику холестеатома. Према томе, степен коштане деструкције структура средњег ува зависио је



од дужине развоја холестеатома, локализације и екстензивности холестеатомског процеса и истовременог присуства инфекције. Присуство инфекције смо верификовали узимањем бриса ува преоперативно или интраоперативно (36 од 50 испитаника, односно 72% је имало позитиван брис), при чему су најчешће нађене следеће бактерије: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus species* и *Proteus mirabilis*, а ређе *Echerichia coli*, *Enterococcus fecalis* и *Corinebacillus*, а у појединим мешовита флора.

Према клиничким карактеристикама стеченог холестеатома све испитанике смо разврстали у неколико група. Прву групу (А) су чинили испитаници са већом деструкцијом коштаних структура средњег ува, док је друга група (Б) обухватала болеснике са мањом деструкцијом коштаних структура средњег ува. У прву групу су разврстани болесници који су, осим разорених слушних кошчица, имали и оштећење зидова кавума тимпани и мастоидног наставка (фацијални канал, лабиринт, тегмен тимпанума или антрума, денудираност дуре или сигмоидног синуса). Друга група је укључивала испитанике без коштаних оштећења или је регистрована минимална коштана деструкција (само деструкција дугог крака инкуса или само дела малеуса или само дела стапеса).

Присуство бактеријске инфекције је процењивано на основу налаза бриса ува као и отомикроскопским и интраоперативним налазом присуства секрета, инфламираног полипа и гранулација, влажног дебриса и мацериране коже спољног слушног ходника. На основу ових параметара испитаници су разврстани у групу испитаника са присутном инфекцијом (Ц). Групу испитаника са холестеатомима без инфекције (Д) су чинили они испитаници са холестеатомима у виду суве перфорације бубне опне са присутним сувим холестеатомским масама, сувим кератином или крустом и негативним брисом ува на присуство бактерија како преоперативни тако и интраоперативно.

Екстензивност холестеатома је процењивана према захваћености одређених регија средњег ува (епитимпанум, мезотимпанум, протимпанум, хипотимпанум, антрум и мастоидне ћелије). На основу проширености холестеатомског процеса, сви болесници су разврстани у две групе. Групу испитаника са већом екстензивношћу холестеатома (Е) чинили су холестеатоми који су захватили три и више региона средњег ува (нпр. епитимпанум, антрум и мастоидне ћелије или епитимпанум, мезотимпанум,

хипотимпанум и антрум). Групу испитаника са мање екстензивним холестеатомима (Ф) чинили су холестеатоми који су захватили до два региона средњег ува (нпр. само епитимпанум или епитимпанум и протимпанум).

На основу клиничких карактеристика холестеатома, узимајући као параметре степен коштане деструкције, присуство/одсуство инфекције и екстензивност холестеатомског процеса, распоредили смо испитанике у неколико група чија је бројност приказана у табели 4.

Клиничке карактеристике холестеатома	Група испитаника	Број испитаника
Степен коштане деструкције	А. Већа коштана деструкција	29
	Б. Мања коштана деструкција	21
Инфекција	Ц. Присуство инфекције	36
	Д. Одсуство инфекције	14
Екстензивност холестеатомског процеса	Е. Већа екстензивност холестеатома	34
	Ф. Мања екстензивност холестеатома	16

**Табела 4. Клиничке карактеристике холестеатома**

#### **4.4. Хистопатолошка испитивања стеченог холестеатома средњег ува**

Хистопатолошким испитивањима је анализирано око 150 узорак стеченог холестеатома средњег ува 50 испитаника, као и по један узорак ткива коже спољашњег слушног ходника и по један узорак ткива ретроаурикуларне коже од сваког испитаника. Анализиране су хистопатолошке карактеристике матрикса и периматрикса. На основу општих хистопатолошких карактеристика кератинизације матрикса, пролиферације колагена и инфилтрације периматрикса запажена је изразита хетерогеност матрикса и периматрикса стеченог холестеатома. У 17 од 50 стечених холестеатома (34%) била је упадљиво изражена кератинизација која се манифестовала присуством великих наслага кератина, слојевито распоређених и њихова ексфолијација од већег дела епитела. Холестеатомски матрикси који су се састојали од танког епитела, распоређених у 3-4 слоја

имали су по правилу најизраженије кератинске наслаге (слика 10). У осталих 33 стечених холестеатома (66%) кератинизација је био слабо или умерен изражена са кератином који је углавном везан за рожасте слој матрикса (слика 9). Резултати приказани у табели 5. показују да је просечан индекс кератинизације био  $2,20 \pm 0,904$ , што одговара умерено израженим кератинским наслагама. Анализом епитела матрикса такође је уочена изразита хетерогеност. Било је матрикса различите промера, од 3-21 слоја дебљине, са микроцистама и кератинским перлама у епителу, што иде у прилог хистопатолошке хетерогености. У 15 од 50 стечених холестеатома (30%) била је присутна хиперплазија епитела, са преко 10 слојева кератиноцита и упадљиво израженим грануларним слојем. Изразиту хиперплазију епитела углавном су пратили и изражени запаљенски инфилтрати, у највећем проценту локализовани субепително у периматриксу. У појединим препаратима уочен је папиларни изглед периматрикса са дубљим и плићим инвагинацијама епитела. Између кератиноцита спорадично су очуване и друге некератоцитне ћелије као што су Лангерхансове ћелије, лимфоцити и макрофаги.

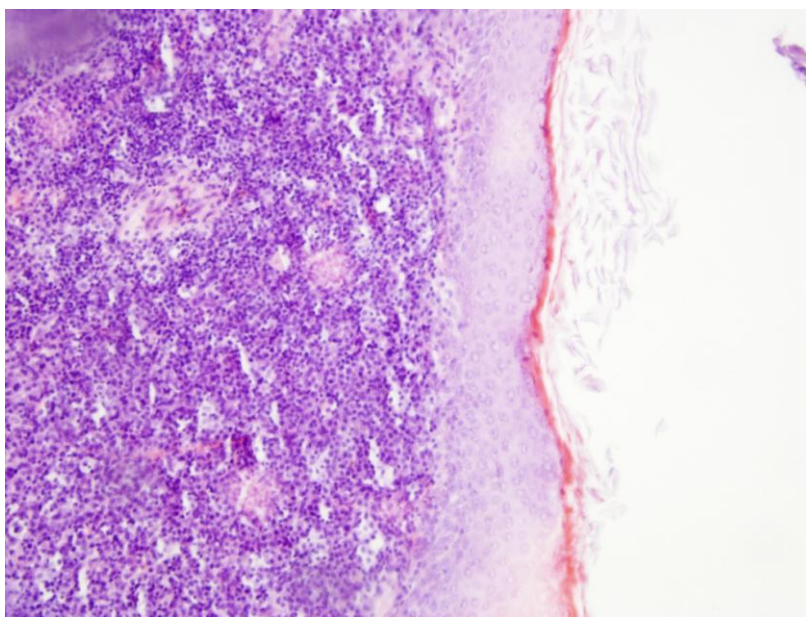
Периматрикс је преодоминантно био инфилтриран моноклеарним ћелијама различитог броја и дистрибуције. Моноклеарни запаљенски инфилтрати су се састојали од лимфоцита различитих величина, гранулоцита, плазмоцита, макрофага и моноцитима сличних ћелија и то груписани у мање или веће агрегате – групице ћелија или гроздолике и фоликуларне структуре. Ћелијски агрегати су најчешће били локализовани у субепителном слоју периматрикса. У појединим холестеатомима били су присутни веома крупни макрофаги тзв. мултинуклеарни макрофаги карактеристика циновских ћелија. Само у неким холестеатомима доминирали су гранулоцити. Просечан индекс запаљенског инфилтрата је био  $2,16 \pm 1,017$ , што одговара умерено израженом ћелијском инфилтрату (табела 5). У периматриксу је уочена изразита хетерогеност крвних судова, нарочито у суперфицијалним слојевима периматрикса, који су углавном били дилатирани са променама карактеристичним за васкулитис, уз присутну хијалинозу, склерозу и облитерацију појединих крвних судова тромбом. У неким холестеатомима било је присутно младо гранулационо ткиво или делови слузнице средњег ува. Степен заступљености екстрацелуларног матрикса, односно колагена у периматриксу холестеатома је био изразито различит. Просечан индекс пролиферације колагена је био  $1,92 \pm 1,158$ , што одговара умерено израженом колагену (табела 5).

Хистопатолошке карактеристике холестеатома	Индекс (ср.вредност ± SD)	Број испитаника
Кератинизација	2,20 ± 0,904	50
Запаљенски инфилтрат	2,16 ± 1,017	50
Пролиферација колагена	1,92 ± 1,158	50

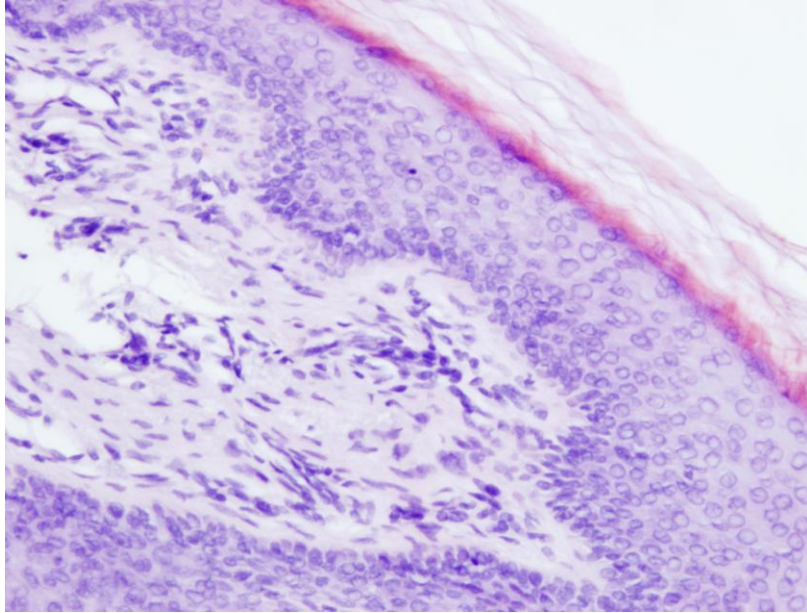
SD – стандардна девијација

**Табела 5. Средње вредности индекса хистопатолошких карактеристика холестеатома**

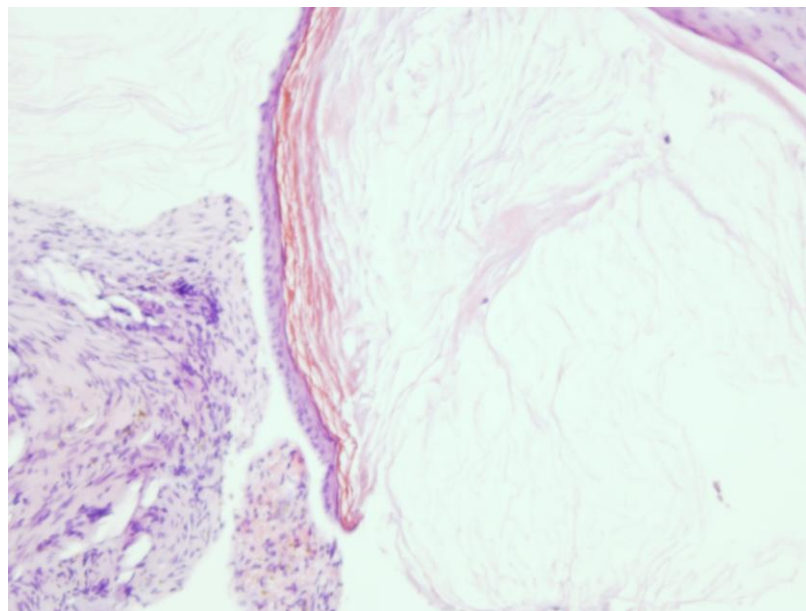
Слике од 8 до 12 илуструју различите хистоморфолошке карактеристике стеченог холестеатома и нормалну грађу коже спољашњег слушног ходника и ретроаурикуларне регије (хематоксилин-еозин бојење).



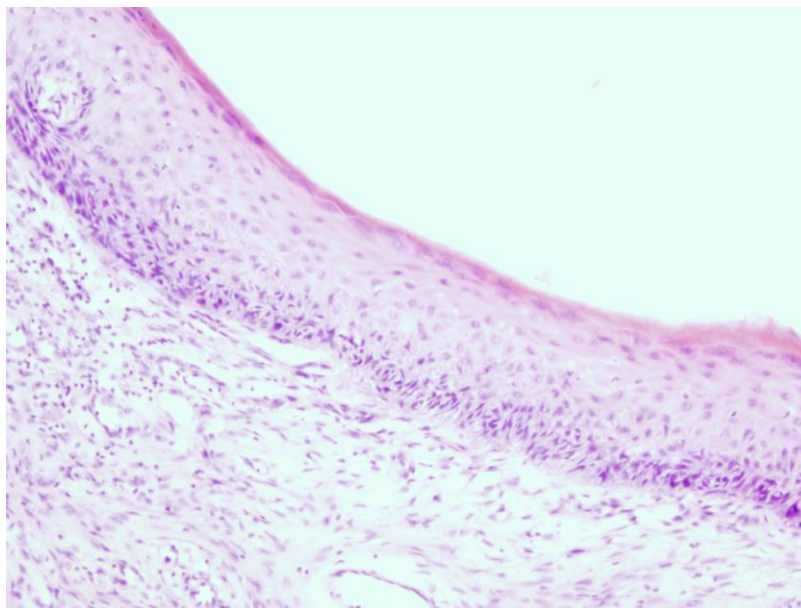
**Слика 8.** Патохистолошка слика агресивне форме стеченог холестеатома са израженим запаљенским инфилтратом и младим гранулационим ткивом у периматриксу. Хиперплазија кератиноцита у 10-12 слојева у матриксу. Оскудне кератинске наслаге. (увеличање 200х).



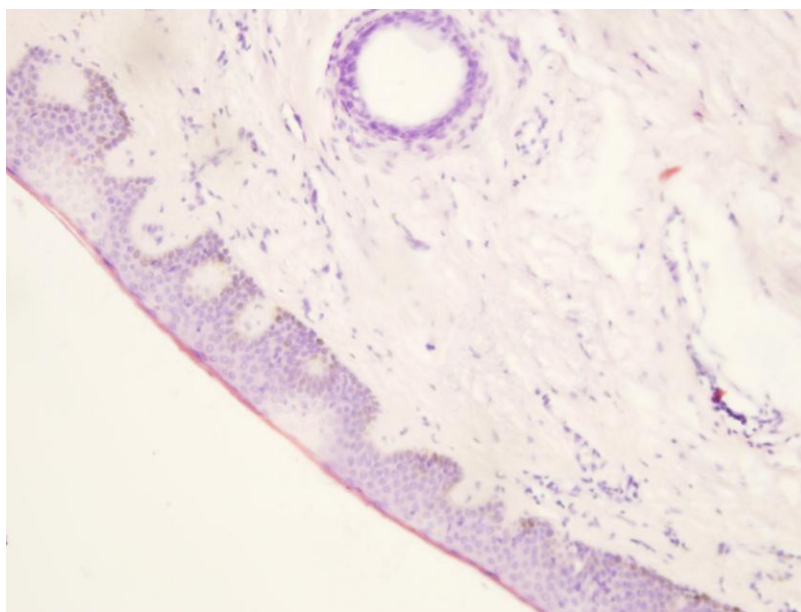
**Слика 9.** Патохистолошка слика стеченог холестеатома са благом инвагинацијом матрикса у периматрикс, оскудне структуре периматрикса и са мањим кератинским наслагама. (увеличање 200x).



**Слика 10.** Патохистолошка слика стеченог холестеатома са великим наслагама кератина и кератинском цистом оивиченом танким матриксом од 3-4 слоја кератиноцита. Доминира колаген у периматриксу (увеличање 100x).



**Слика 11.** Патохистолошка слика коже спољашњег слушног ходника (увеличање 200x).

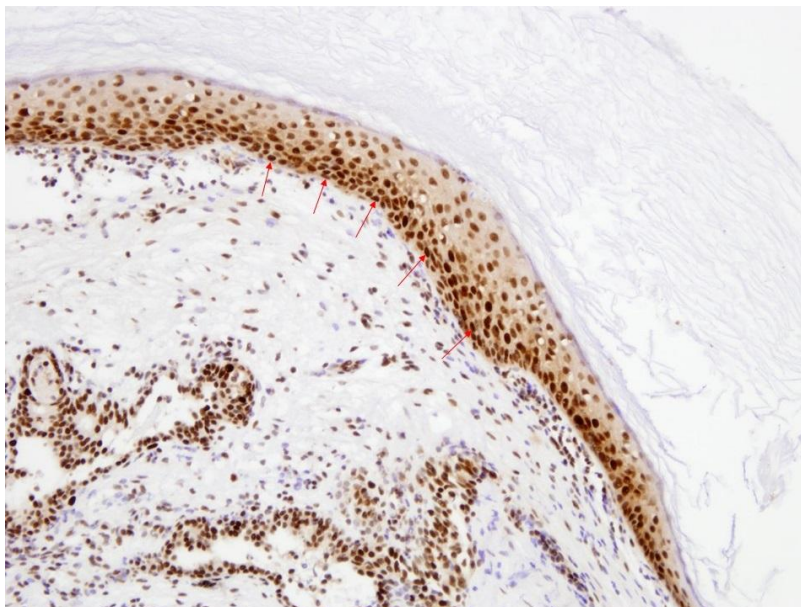


**Слика 12.** Патохистолошка слика коже ретроаурикуларне регије (увеличање 100x).

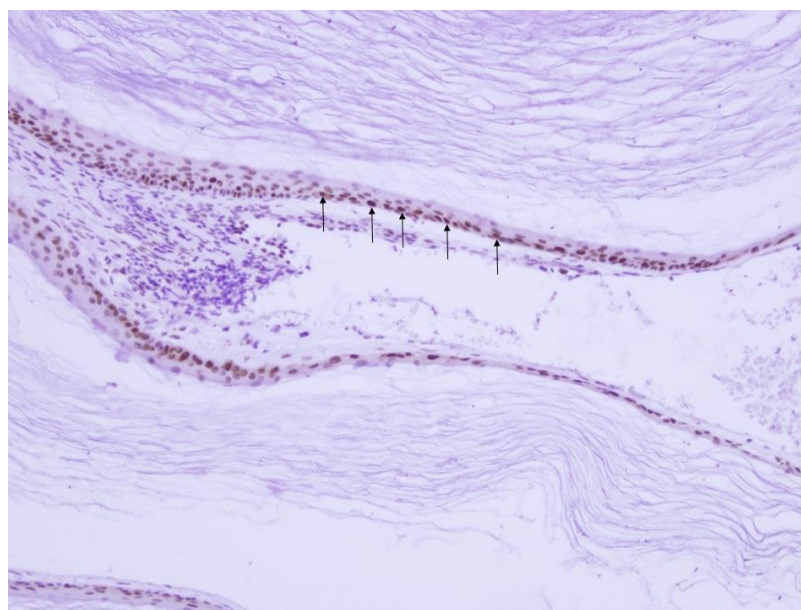
#### 4.5. Имунохистохемијска испитивања стеченог холестеатома

Истраживали смо и упоређивали експресију ћелијских пролиферативних и инфламаторних маркера PCNA, Ki-67, COX-2, CD4 и CD8 Т лимфоцита на 3 ткивна препарата сваког оперисаног пацијента и то: препарат холестеатома, препарат коже спољашњег слушног ходника и препарат коже ретроаурикуларне регије, од укупно 50 оперисаних пацијената са стеченим холестеатомом средњег ува. Такође испитивали смо утицај пролиферативних и инфламаторних агенаса на развој стеченог холестеатома, упоређујући експресију PCNA, Ki-67, COX-2, CD4 и CD8 Т лимфоцита у различитим групацијама холестеатома груписаних према хистолошким и клиничким карактеристикама стеченог холестеатома.

PCNA је био високо детектибилан у холестеатому, у односу на кожу спољашњег слушног ходника и кожу ретроаурикуларне регије. Експресија PCNA је детектована у пролиферишућим ћелијама базалног и супрабазалног слоја матрикса холестеатома, а ретко у вишим слојевима матрикса. Код повећане пролиферације кератиноцита у матриксу стеченог холестеатома, детектована је експресија PCNA и у грануларном слоју матрикса, што говори у прилог неселективности PCNA као ћелијског маркера пролиферације (слика 13). Код стечених холестеатома са одсутном инфекцијом, а са већим кератинским наслагама и повећаном кератинизацијом, експресија PCNA је била мање заступљена (слика 14).



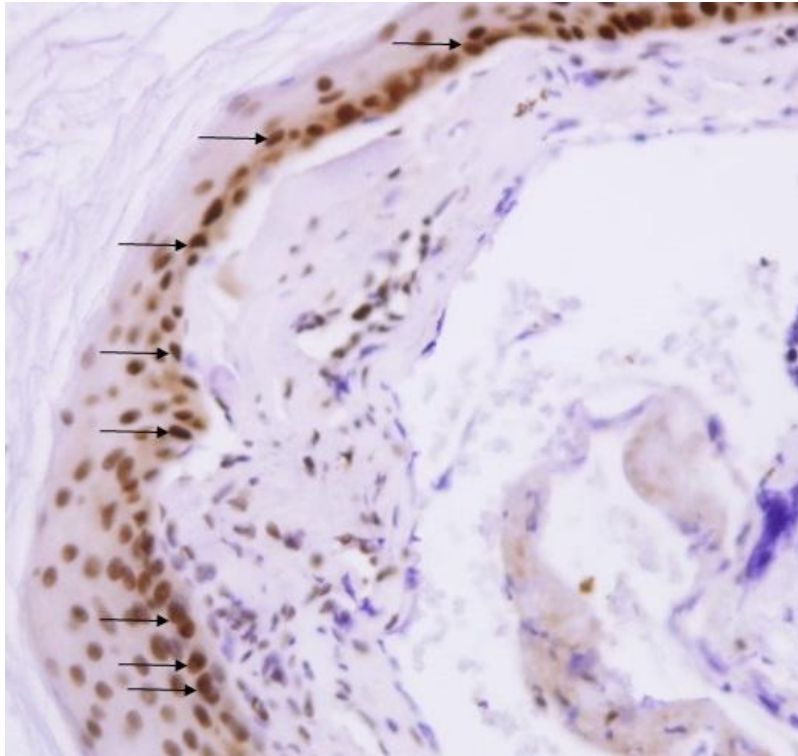
**Слика 13.** Упадљиво изражена експресија PCNA (обележено стрелицама) у матриксу стеченог холестеатома (увеличање 100x).



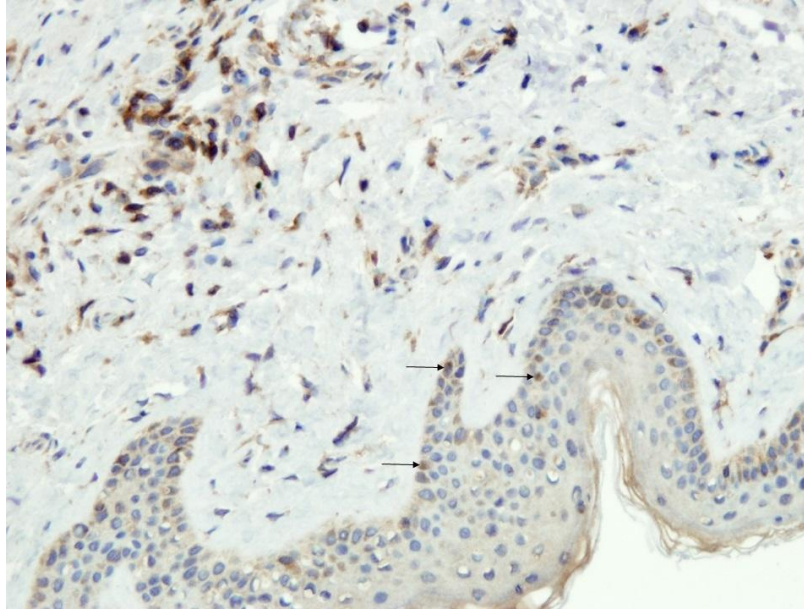
**Слика 14.** Слабо изражена експресија PCNA (обележено стрелицама) у матриксу стеченог холестеатома са танким матриксом и масама кератинских наслага (увеличање 50x)



У поређењу са стеченим холестеатомом, експресија PCNA у кожи спољашњег слушног ходника и кожи ретроаурикуларне регије је слабије детектовна, нарочито у кожи ретроаурикуларне регије, где се детектибилност углавном верификована у појединачним ћелијама (слике 15 и 16).

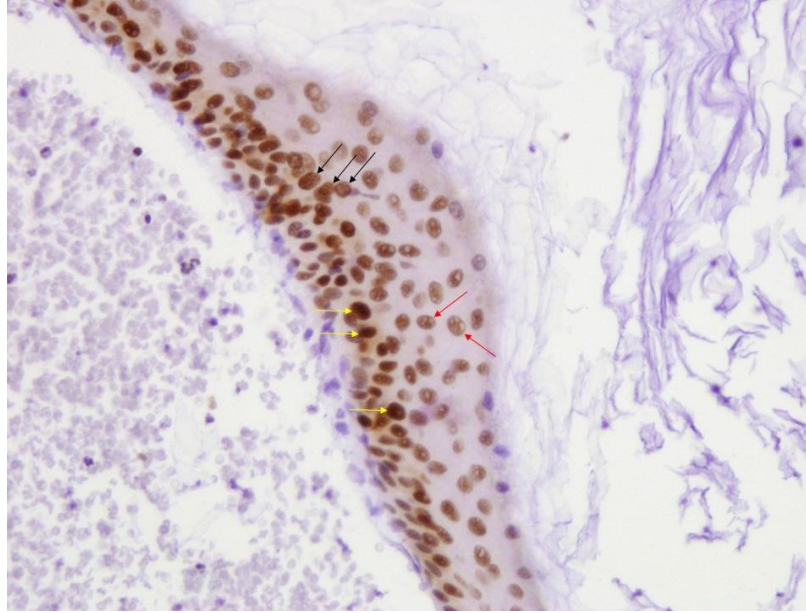


**Слика 15.** Експресија PCNA у кожи спољашњег слушног ходника. Изразита детектибилност (обележено стрелицама) у базалном слоју (увеличање 200x).



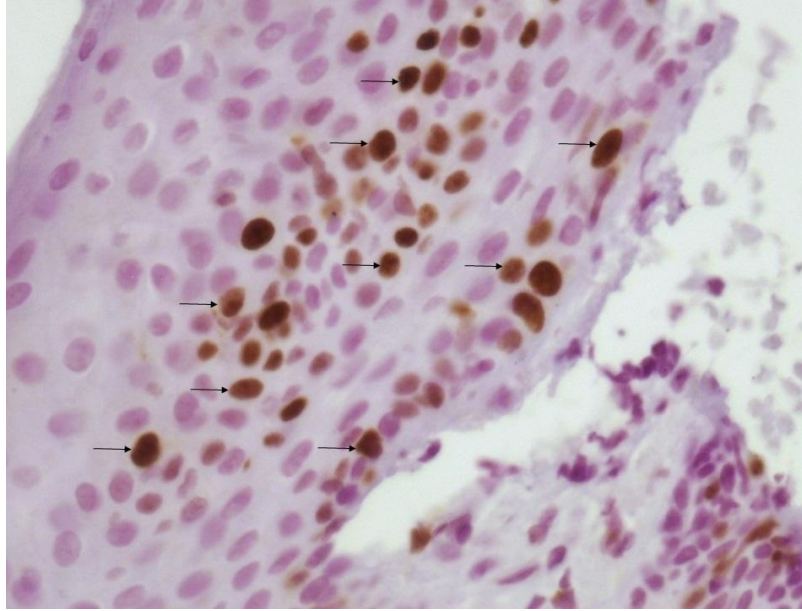
**Слика 16.** Експресија PCNA у кожи ретроаурикуларне регије. Само поједини кератиноцити базалног слоја (обележено стрелицама) су детектибилни (увеличање 200х)

Ki-67 је показао велику детектибилност у холестеатому, у односу на кожу спољашњег слушног ходника и кожу ретроаурикуларне регије. Повећан број пролиферишућих кератиноцита, који показују специфичну Ki-67 имунореактивност, детектован је у базалном и супрабазалном слоју, а ређе у вишим слојевима матрикса свих испитиваних холестеатома. Експресија кератиноцита Ki-67 маркером је била заступљена у свим активним фазама ћелијског циклуса, што се најбоље види по различитом типу пребојавања једара (слика 17).

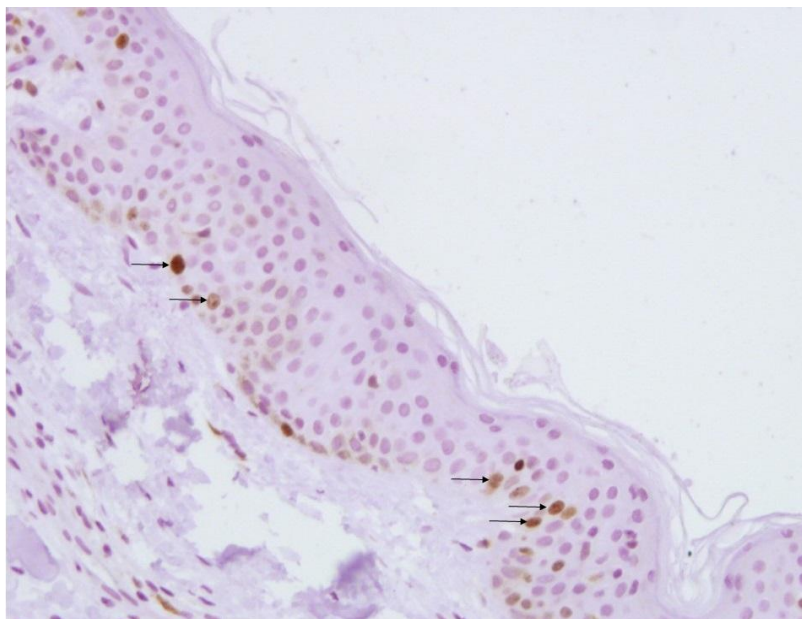


**Слика 17.** Експресија Ki-67 у матриксу холестеатома. Различита пребојеност једара кератиноцита: 1. гранулиран (црвене стрелице), 2. дифузан (жуте стрелице) и 3. мешовити тип једарног пребојавања (плаве стрелице), (увеличање 200x).

Експресија Ki-67 је била слабо до умерено изражена и у кожи спољашњег слушног ходника, док је у ретроаурикуларној кожи била слаба (слике 18 и 19). Базални слојеви нормалног епидермиса експримују Ki-67, док се Ki-67 ретко детектује у супрабазалним слојевима коже. Кожа око анулуса тимпаникуса у спољашњем слушном ходнику има велики потенцијал пролиферације, одакле смо углавном узимали узорак ткива, па не чуди појава експресије Ki-67 у супрабазалним слојевима у кожи спољашњег слушног ходника.

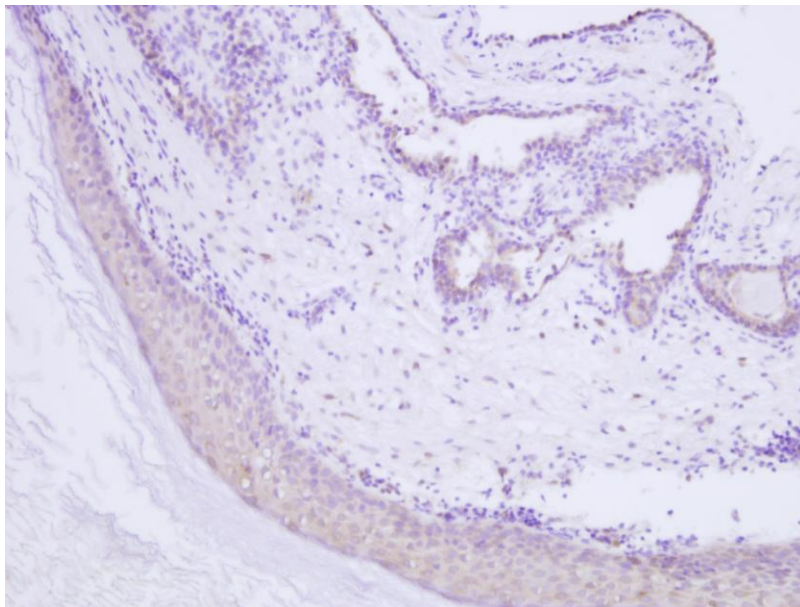


**Слика 18.** Експресија Ki-67 у кожи спољашњег слушног ходника. Стрелице показују бројне експримоване кератиноците у базалним и супрабазалним слојевима коже (увеличање 400х).

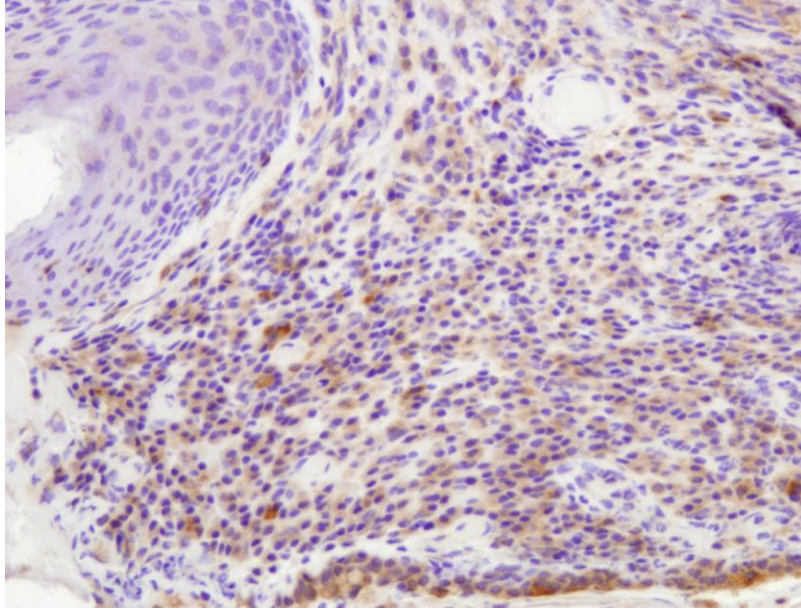


**Слика 19.** Експресија Ki-67 у кожи ретроаурикуларне регије. Стрелице показују ретке, појединачне, експримоване кератиноците у базалном слоју (увеличање 200х).

СОХ-2 је детектован у свим узорцима стеченог холестеатома, углавном као слабо до умерено изражено пребојавање (имунореактивност до 50%) матрикса холестеатома (слика 20). Изражена експресија СОХ-2 у стеченом холестеатому (имунореактивност преко 50%) била је у малом броју случајева (18% од укупног броја испитаника) и праћена је израженом лимфоцитном пролиферацијом у периматриксу, као и повећаном пролиферацијом у матриксу (слика 21).

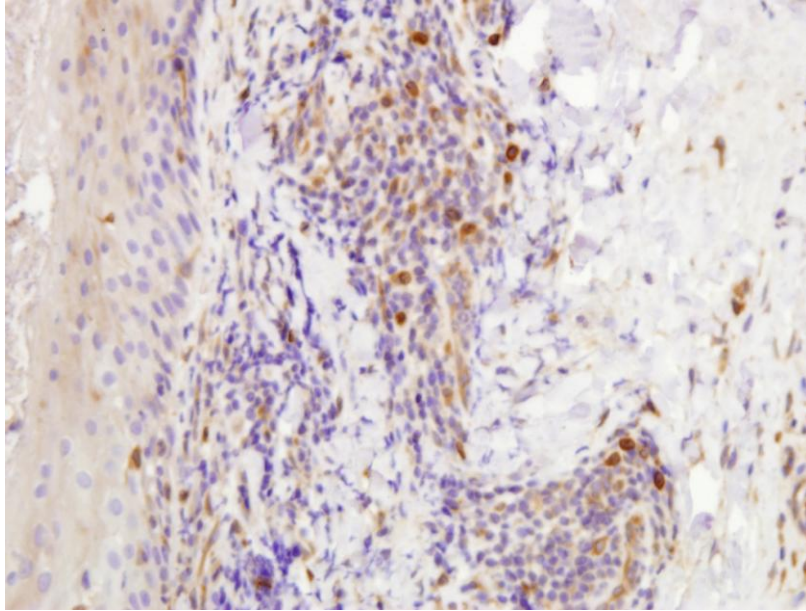


**Слика 20.** Слабо изражена експресија СОХ2 у стеченом холестеатому. Имунореактивност присутна само у матриксу (увеличање 100х).

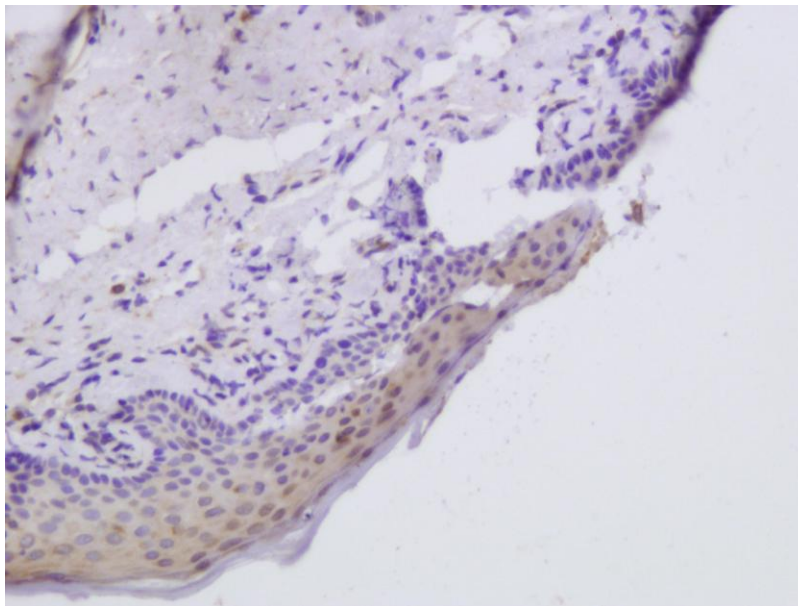


**Слика 21.** Упадљиво изражена експресија СОХ-2 у стеченом холестеатому. Имунореактивност прати дифузну лимфоцитну инфилтрацију периматрикса, док је мања детектибилност у матриксу (увеличање 200х).

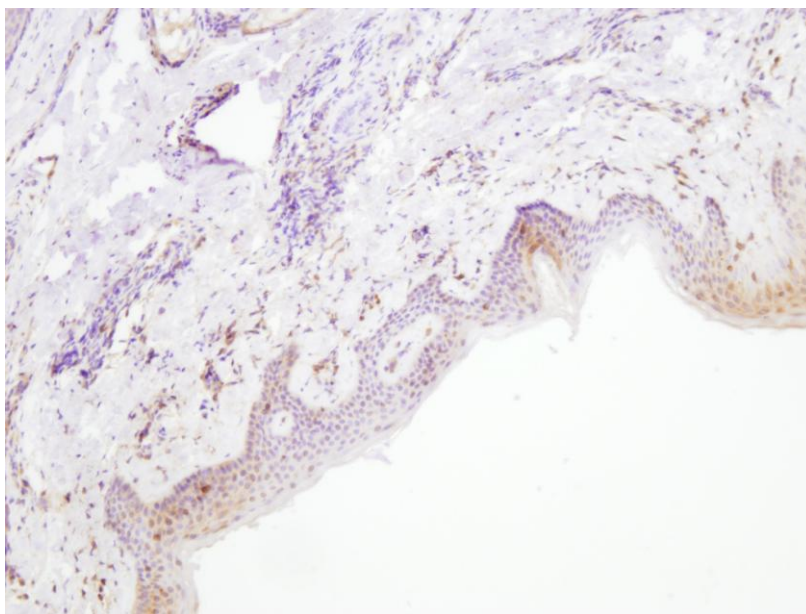
Такође постоји изразита разноликост у експресији СОХ-2 у узорцима коже спољашњег слушног ходника, што је илустровано на сликама 22 и 23. СОХ-2 је готово био недектибилан у узорцима коже ретроаурикуларне регије (слика 24).



**Слика 22.** Умерено изражена експресија COX2 у кожи спољашњег слушног ходника. Имунореактивност прати накупине мононуклеарних ћелија субепителијално, а постоји детектибилност и у епителу (увеличање 200х).



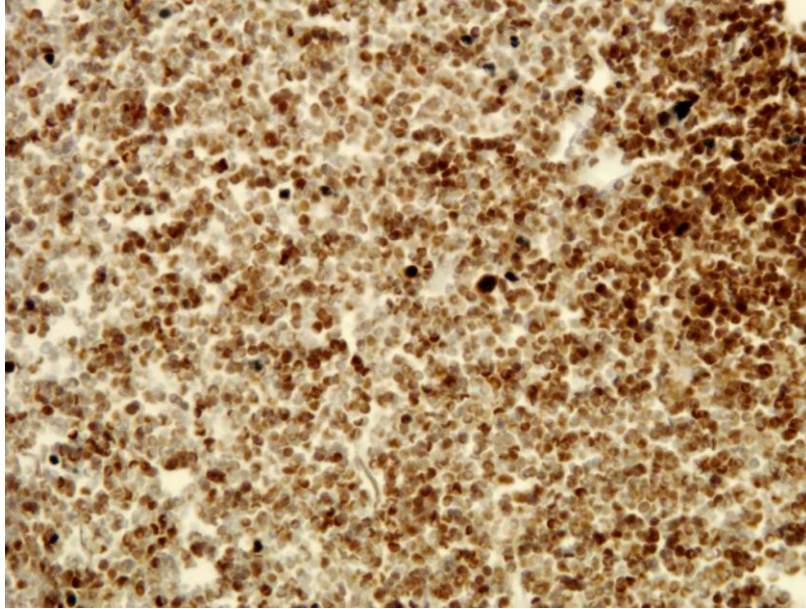
**Слика 23.** Слабо изражена експресија COX2 у кожи спољашњег слушног ходника. Имунореактивност присутна само у епителу (увеличање 200х).



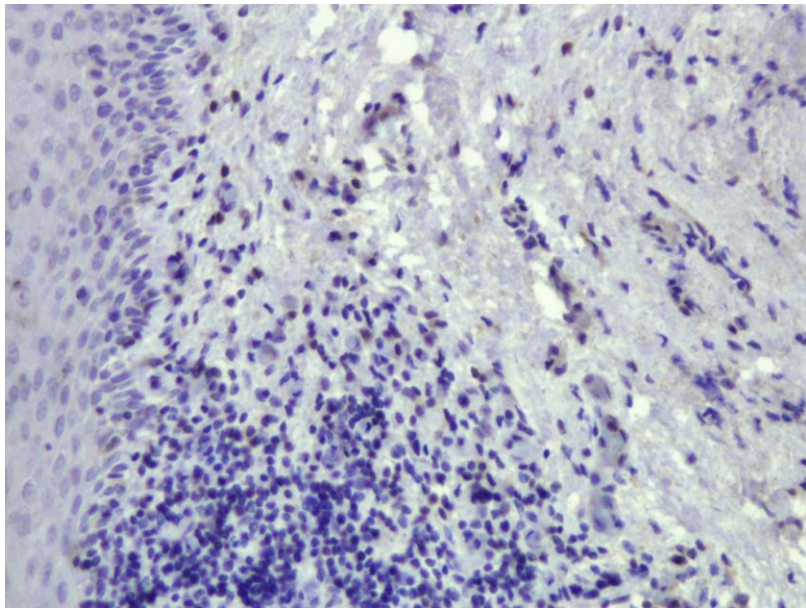
**Слика 24.** Слабо изражена експресија COX2 у ретроаурикуалрној кожи.  
Имунореактивност фокално присутна у епителу (увеличање 100х).

CD4 маркер је био одлично испољен на субпопулацији помоћничких Т лимфоцита у узорцима стеченог холестеатома. Детектовани су обилни дифузни инфилтрати CD4 лимфоцита у периматриксу или су постојале мање или веће накупине лимфоцита у тзв. кластер формацијама (слике 25 и 26). Експресија CD4 лимфоцита у матриксу холестеатома је била углавном оскудна до слабо изражена, док је морфологија CD4+ ћелија била разнолика, округласта доминантно, а повремено атипична, издуженог или звездоликог облика са мањом или већом хиперхромазијом једара.



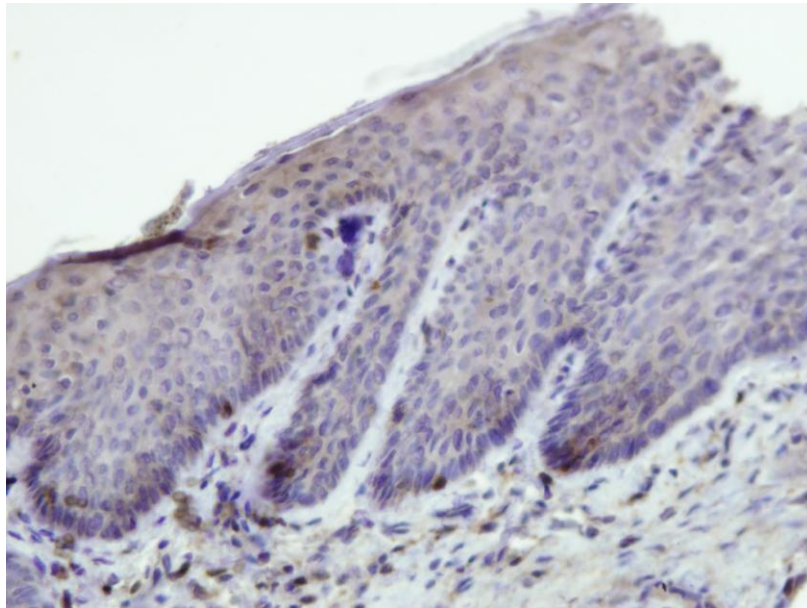


**Слика 25.** Упадљиво изражена (масивна) инфилтрација периметрика стеченог холестеатома CD4 лимфоцитима (увеличање 200х).

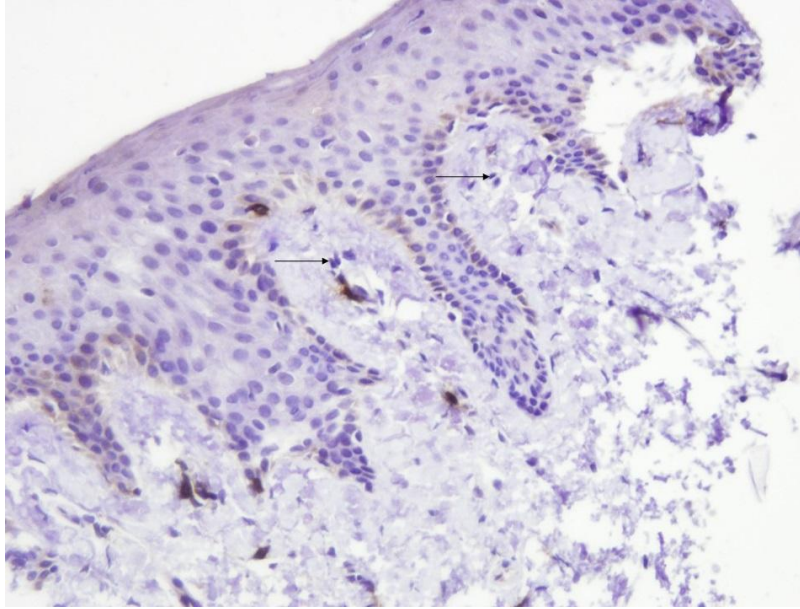


**Слика 26.** Кластер инфилтрација периметрика стеченог холестеатома CD4 лимфоцитима, уз појединачне CD4+ ћелије у матриксу (увеличање 200х).

Експресија CD4 лимфоцита је била углавном слабо до умерено изражена у узорцима коже спољашњег слушног ходника уз преминацију субепителног распорада CD4+ ћелија, док је у кожи ретроаурикуларне регија детектибилност била једва приметна (слике 27 и 28).

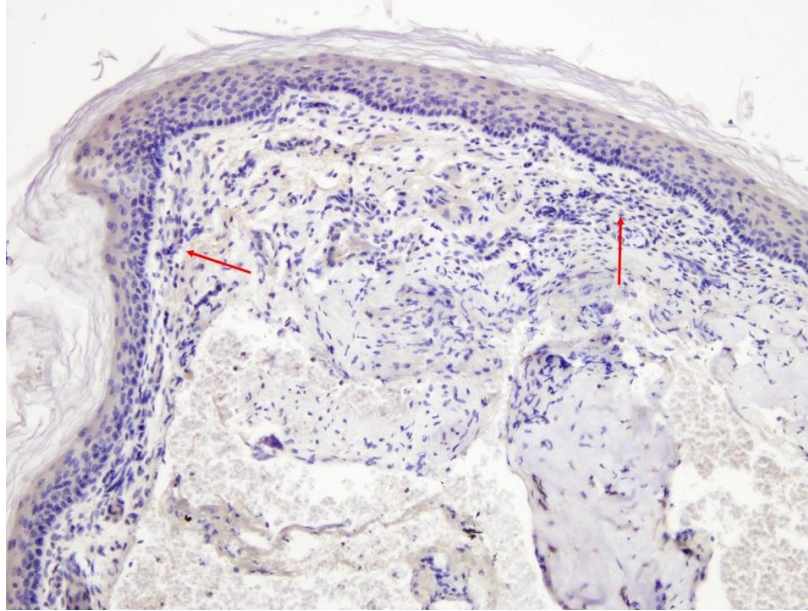


**Слика 27.** Субепителна дистрибуција Т лимфоцита експримованих CD4 маркером у кожи спољашњег слушног ходника (увеличање 200х).

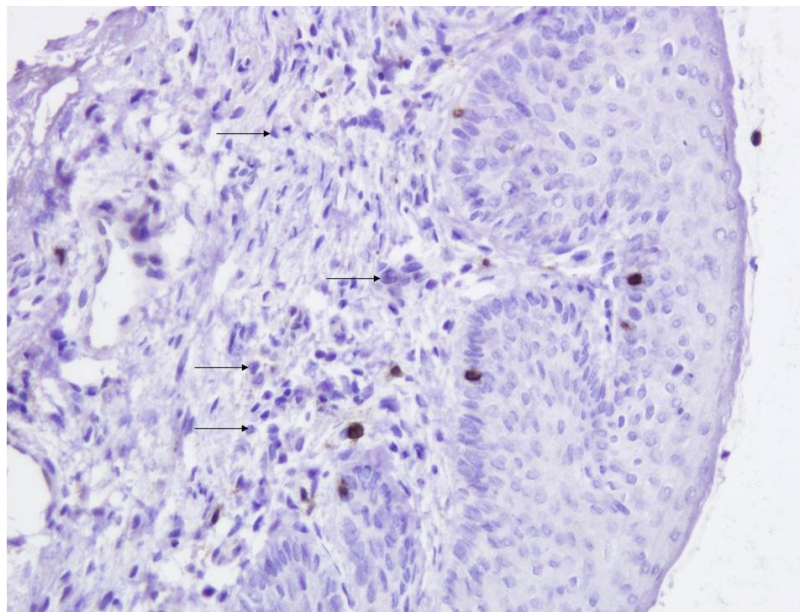


**Слика 28.** Појединачни Т лимфоцити (црне стрелице) експримовани CD4 маркером у ретроаурикуларној кожи (увеличање 200х).

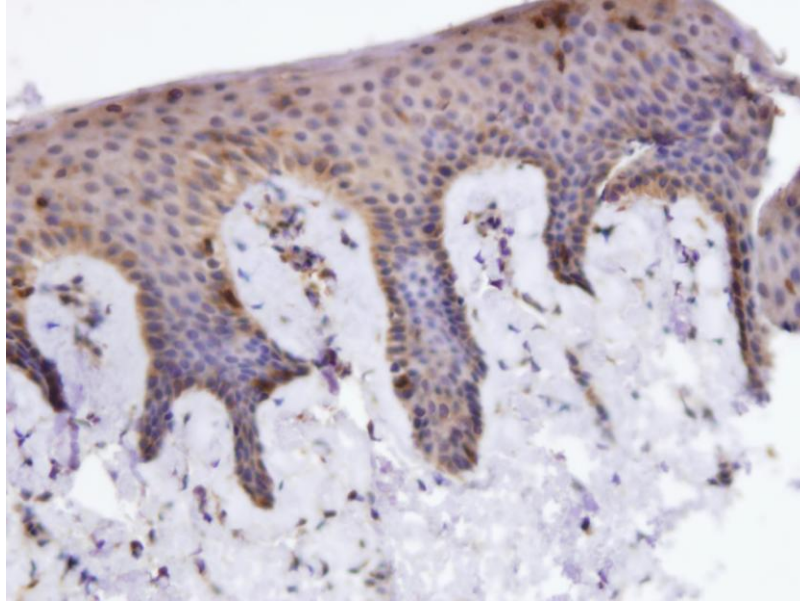
Експресија CD8 лимфоцита је слабија од експресије CD4 лимфоцита у узорцима стеченог холестеатома, са субепителном дистрибуцијом цитотоксичних Т лимфоцита у периматриксу холестеатома (слика 29). Експресија CD8 лимфоцита у кожи спољашњег слушног ходника је мања од експресије CD8 лимфоцита у холестеатому, док је у кожи ретроаурикуларне регије минимална (слике 30 и 31).



**Слика 29.** Умерено изражена субепителна инфилтрација (црвене стрелице) периметрикса стеченог холестеатома CD8 лимфоцитима (увеличање 200х).



**Слика 30.** Слабо изражена експресија CD8 лимфоцита у кожи спољашњег слушног ходника (увеличање 200х).



**Слика 31.** Одсутна експресија CD8 лимфоцита у ретроаурикуларној кожи (увеличање 200х).

#### **4.6. Однос клиничких, хистопатолошких и имунохистохемијских карактеристика холестеатома**

Резултати поређења узорака ткива стеченог холестеатома и коже спољашњег слушног ходника и ретроаурикуларне регије према клиничким, патохистолошким и имунохистохемијским карактеристикама стеченог холестеатома, приказани су табеларно и графиконима. Нема статистичке значајности у корелацији индекса кератинизације, индекса запаљенског инфилтрата и индекса пролиферације колагена према степену коштане деструкције стеченог холестеатома. Не постоји статистички значајна разлика у индексу патохистолошких карактеристика стеченог холестеатома и експресије маркера PCNA, Ki-67, COX2 и CD8 у холестеатому између групе испитаника са већом коштаном деструкцијом у односу на групу испитаника са мањом коштаном деструкцијом структура средњег ува. Постоји високо статистички значајна разлика у експресији CD4 лимфоцита (25,384,  $p=0,001$ ) у холестеатому и у спољашњем слушном ходнику (18,443,  $p=0,001$ ) у односу на степен коштане деструкције (табела 6 и 7).

Коштана деструкција	Керати- зација	Запаљ. инфилтр.	Кола- ген	PCNA	Ki-67	COX2	CD4	CD8
Већа кошт. деструкција	29	29	29	29	29	29	29	29
Индекс	2,10	2,28	1,97	3,79	3,41	2,39	3,93	3,07
SD	0,976	0,960	1,149	0,412	0,780	0,620	0,408	0,913
Мања кошт. деструкција	21	21	21	21	21	21	21	21
Индекс	2,33	2,00	1,86	3,81	3,00	2,03	3,24	2,45
SD	0,796	1,095	1,195	0,402	0,949	1,076	0,982	1,061
$\chi^2$ тест	2,149	2,160	0,144	0,021	3,210	2,278	25,384	1,149
Df	3	3	3	1	3	2	1	2
P	0,542	0,540	0,986	0,886	0,360	0,320	0,001**	0,563

SD – стандардна девијација, Df – степен слободе, P – статистичка значајност

\*\* висока статистичка значајност

**Табела 6. Однос патохистолошких и имунохистохемијских карактеристика холестеатома према степену коштане деструкције холестеатома**

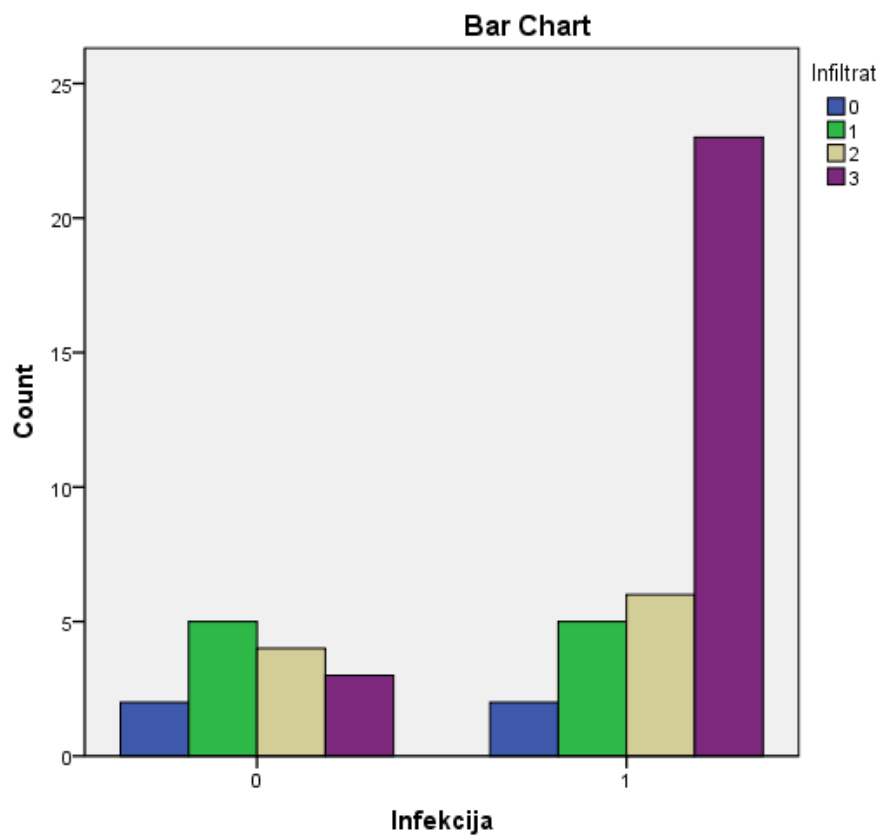
Коштана деструкција	PCNA ssh	PCNA ra	Ki-67 ssh	Ki-67 Ra	COX2 Ssh	COX2 ra	CD4 ssh	CD4 ra	CD8 ssh	CD8 ra
Већа кошт. деструкција	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
Индекс	2,62	1,69	2,24	1,55	2,32	1,69	3,21	1,71	2,12	1,33
SD	0,622	0,471	0,830	0,506	0,871	0,471	0,904	0,609	0,734	0,453
Мања кошт. деструкција	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Индекс	2,71	1,71	2,05	1,43	2,12	1,76	2,24	1,66	1,96	1,23
SD	0,463	0,463	0,498	0,507	0,740	0,539	0,692	0,512	0,634	0,412
$\chi^2$ тест	1,551	0,035	3,658	0,739	3,353	1,414	18,443	1,409	1,149	1,763
Df	2	1	3	1	2	2	3	1	2	1
P	0,460	0,851	0,301	0,390	0,187	0,493	0,001**	0,235	0,563	0,184

SD – стандардна девијација, Df – степен слободе, P – статистичка значајност, \*\* висока статистичка значајност, ssh - спољашњи слушни ходник, ra - ретроаурикуларна регија

**Табела 7. Однос експресије маркера ћелијске пролиферације и инфламације коже спољашњег слушног ходника и ретроаурикуларне регије према степену коштане деструкције холестеатома**

Постоји статистички значајна разлика у индексу кератинизације холестеатома према присуству/одсуству инфекције (9,416,  $p=0,028$ ) и то тако да је изражена кератинизација у холестеатомима без инфекције. Постоји статистичка значајност индекса запаљенског инфилтрата холестеатома (7,830,  $p=0,049$ ) у групама испитаника са одсутном/присутном инфекцијом холестеатома, при чему холестеатоми са присутном инфекцијом показују углавном упадљиво изражен запаљенски ћелијски инфилтрат (24 од 36 испитаника, односно 67% испитаника у групи холестеатома са инфекцијом има упадљиво изражен запаљенски инфилтрат) у хистопатолошкој слици (графикон 1).

Постоји статистички значајна разлика у експресији CD4 лимфоцита у холестеатому (5,654,  $p=0,041$ ) и у кожи спољашњег слушног ходника (7,912,  $p=0,048$ ) у односу на присуство/одсуство инфекције (табела 8 и 9).



0 – одсутна инфекција, 1 – присутна инфекција

**Графикон 1.** Индекс запаљенског инфилтрата у групи испитаника са стеченим холестеатомом средњег ува са одсутном/присутном инфекцијом



Инфекција холестеатома	Керати-зација	Запаљ. инфилтр.	Кола-ген	PCNA	Ki-67	COX2	CD4	CD8
Одсутна инфекција	14	14	14	14	14	14	14	14
Индекс	2,77	1,57	1,64	3,71	3,07	2,44	3,05	2,37
SD	0,852	1,016	1,336	0,469	0,917	0,842	0,799	0,921
Присутна инфекција	36	36	36	36	36	36	36	36
Индекс	2,06	2,39	2,03	3,83	3,31	3,04	3,79	3,00
SD	0,893	0,934	1,082	0,378	0,856	0,867	0,608	0,904
$\chi^2$ тест	9,416	7,830	2,698	0,893	6,016	0,107	5,654	0,450
Df	3	3	3	1	3	2	1	2
P	0,024*	0,049*	0,441	0,345	0,111	0,948	0,041*	0,799

SD – стандардна девијација, Df – степен слободе, P – статистичка значајност,

\* - статистички значајна разлика

**Табела 8. Однос патохистолошких и имунохистохемијских параметара испитивања према присуству/одсуству инфекције стеченог холестеатома**

Инфекција холестеатома	PCNA ssh	PCNA ra	Ki-67 ssh	Ki-67 Ra	COX2 ssh	COX2 ra	CD4 ssh	CD4 ra	CD8 ssh	CD8 ra
Одсутна инфекција	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
Индекс	2,54	1,67	2,13	1,43	2,13	1,65	1,96	1,12	2,13	1,18
SD	0,813	0,453	0,723	0,412	0,766	0,423	0,712	0,213	0,608	0,241
Присутна инфекција	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Индекс	2,79	1,94	2,48	1,54	2,43	1,68	2,86	1,52	2,31	1,21
SD	0,754	0,432	0,543	0,465	0,656	0,412	0,918	0,428	0,676	0,251
$\chi^2$ тест	0,620	0,302	2,188	0,397	1,546	0,640	7,912	3,209	3,794	0,397
Df	2	1	3	1	2	2	3	3	2	1
P	0,733	0,582	0,534	0,529	0,462	0,726	0,048*	0,241	0,150	0,529

SD – стандардна девијација, Df – степен слободе, P – статистичка значајност, \* - статист. значајна разлика, ssh - спољашњи слушни ходник, ra - ретроаурикуларна регија

**Табела 9. Однос експресије маркера ћелијске пролиферације и инфламације коже спољашњег слушног ходника и ретроаурикуларне регије према присуству/одсуству инфекције стеченог холестеатома**

Нема статистички значајне разлике између индекса кератинизације, индекса запаљенског инфилтрата и индекса пролиферације колагена према екстензивности холестеатомског процеса. Постоји статистички значајна разлика у експресији CD4 лимфоцита у холестеатому (7,172, p=0,007) и у кожи спољашњег слушног ходника (15,367, p=0,020) у односу на екстензивност холестеатома. У узорцима холестеатома са већом екстензивношћу холестеатомског процеса постоји изражена CD4 + ћелијска имунораективност у стеченом холестеатму и у кожи спољашњег слушног ходника (табела 10 и 11). Није било статистички значајних резултата у експресији осталих маркера ћелијске пролиферације и инфламације PCNA, Ki-67, COX2 и CD8 лимфоцита у кожи спољашњег слушног ходника и ретроаурикуларној кожи.

Екстензивност холестеатома	Керати-низација	Запаљ. инфилтр.	Кола-ген	PCNA	Ki-67	COX2	CD4	CD8
Мања екст.	16	16	16	16	16	16	16	16
Индекс	2,06	1,87	1,56	3,41	2,81	2,34	2,38	2,24
SD	0,816	1,088	1,209	0,403	0,911	1,031	1,002	0,981
Већа екст.	34	34	34	34	34	34	34	34
Индекс	2,50	2,29	2,09	3,79	3,44	2,94	3,76	3,06
SD	0,919	0,970	1,111	0,410	0,786	0,741	0,418	0,996
$\chi^2$ тест	3,566	2,135	2,621	0,023	7,178	1,861	7,172	1,861
Df	3	3	3	1	3	2	1	2
P	0,312	0,545	0,454	0,880	0,066	0,394	0,007**	0,394

SD – стандардна девијација, Df – степен слободе, P – статистичка значајност,

\*\* - висока статистичка значајност

**Табела 10. Однос патохистолошких и имунохистохемијских параметара испитивања холестеатома према екстензивности стеченог холестеатома**

Екстензивност холестеатома	PCNA ssh	PCNA ra	Ki-67 ssh	Ki-67 Ra	COX2 ssh	COX2 ra	CD4 ssh	CD4 ra	CD8 ssh	CD8 ra
Мања екст.	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Индекс	2,69	1,55	2,00	1,31	2,06	1,75	2,15	1,32	1,98	1,18
SD	0,602	0,447	0,632	0,478	0,814	0,577	0,678	0,423	0,632	0,204
Већа екст.	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34
Индекс	2,85	1,68	2,24	1,59	2,46	1,71	3,06	1,36	2,12	1,21
SD	0,544	0,475	0,741	0,500	0,824	0,462	0,982	0,612	0,658	0,243
$\chi^2$ тест	0,858	0,280	2,870	3,309	2,242	1,537	15,367	0,394	1,861	2,168
Df	2	1	3	1	2	1	3	1	2	1
P	0,651	0,597	0,412	0,069	0,326	0,112	0,002**	0,514	0,394	0,141

SD – стандардна девијација, Df – степен слободe, P – статистичка значајност, \*\* - висока статистичка значајност, ssh - спољашњи слушни ходник, ra - ретроаурикуларна регија

**Табела 11. Однос експресије маркера ћелијске пролиферације и инфламације коже спољашњег слушног ходника и ретроаурикуларне коже према екстензивности стеченог холестеатома**

Не постоји статистичка значајност у индексу пролиферације колагена према испитиваним клиничким карактеристикама стеченог холестеатома средњег ува: степену коштане деструкције, присуству/одсуству инфекције и екстензивности холестеатомског процеса.

#### **4.7. Корелација патохистолошких карактеристика холестеатома**

За испитивање односа патохистолошких карактеристика у стеченом холестеатому средњег ува употребљен је *Pearson*-ов коефицијент корелације. *Pearson*-ов коефицијент корелације за патохистолошке карактеристике холестеатома показује високу негативну статистичку

значајност између кератинизације и запаљенског инфилтрата холестеатома (0,369, P=0,008), високу негативну статистичку значајност између кератинизације и колагена холестеатома (0,433, P=0,002), као и високу позитивну статистичку значајност између запаљенског инфилтрата и колагена холестеатома (0,566, P=0,001), (табела 12). Кератинизација у стеченом холестеатому средњег ува је нарочито била изражена код мањег запаљенског инфилтрата и код мањег екстрацелуларног матрикса, односно колагена. Запаљенски инфилтрат у стеченом холестеатому средњег ува је корелирао са развојем колагена у периметриксу.

		Кератини- зација	Запаљенски инфилтрат	Колаген
Кератини- зација	Pearson Correlation P	1		
Запаљенски инфилтрат	Pearson Correlation P	-,369**  ,008	1	
Колаген	Pearson Correlation P	-,433**  ,002	,566**  ,001	1

P – статистичка значајност, \*\* - висока статистичка значајност

**Табела 12. Међусобна повезаност хистопатолошких карактеристика холестеатома**

Кератинизација ( $\chi^2$ тест)	Инфитр.	Колаг.	PCNA	Ki-67	COX2	CD4	CD8
	-0,369	-0,433	2,010	13,942	8,342	4,082	6,838
Df	1	1	3	9	6	3	6
P	0,008**	0,002**	0,570	0,124	0,214	0,253	0,336

Запаљенски Инфилтрат ( $\chi^2$ тест)	Колаг.	PCNA	Ki-67	COX2	CD4	CD8
	0,566	0,072	15,294	9,551	1,656	2,067
Df	1	3	9	6	3	6
P	0,001**	0,995	0,064	0,145	0,647	0,913

Колаген ( $\chi^2$ тест)	PCNA	Ki-67	COX2	CD4	CD8
	0,894	11,788	6,332	1,883	10,886
Df	3	9	6	3	6
P	0,827	0,226	0,310	0,597	0,071

Df – степен слободe, P – статистичка значајност, \*\* - висока статистичка значајност

**Табела 13. Однос хистопатолошких и имунохистохемијских карактеристика холестеатома**

Осим наведене високе статистичке значајности између патохистолошких карактеристика стеченог холестеатома, резултати корелације патохистолошких карактеристика и експресије имунохистохемијских маркера холестеатома су били без добијених статистички значајних вредности. Експресија маркера PCNA, Ki-67, COX-2, CD4 и CD8 Т лимфоцита у холестеатому према патохистолошким карактеристикама холестеатома показује изједначене вредности, без статистички значајних разлика (табела 13).

#### 4.8. Корелација имунохистохемијских маркера

Дистрибуција маркера ћелијске пролиферације и инфламације у узорцима ткива холестеатома, дубоке коже спољашњег слушног ходника и коже ретроаурикуларне регије приказана је табеларно за сваки маркер посебно и то као статистички обрађена корелација (табеле 14-18).

	PCNAhol	PCNAssh	PCNAra
PCNAhol Pearson Correlation	1	,598**	,546**
Sig. (2-tailed)		,001	,001
N	50	50	50
PCNAssh Pearson Correlation	,598**	1	,783**
Sig. (2-tailed)	,001		,001
N	50	50	50
PCNAra Pearson Correlation	,546**	,783**	1
Sig. (2-tailed)	,001	,001	
N	50	50	50

\*\* - висока статистичка значајност, ssh - спољашњи слушни ходник, ra - ретроаурикуларна регија

**Табела 14. Експресија PCNA у холестеатому (PCNAhol), у кожи спољашњег слушног ходника (PCNAssh) и у кожи ретроаурикуларне регије (PCNAra). Постоји високо статистички значајна разлика у експресији PCNA у холестеатому у односу на кожу спољашњег слушног ходника (0,598, P=0,001) и кожу ретроаурикуларне регије (0,546, P=0,001), као и високо статистички значајна разлика у експресији PCNA у кожи спољашњег слушног ходника у односу на кожу ретроаурикуларне регије (0,783, P=0,001).**

		Ki67hol	Ki67ssh	Ki67ra
Ki67hol	Pearson Correlation	1	,465**	,418**
	Sig. (2-tailed)		,001	,003
	N	50	50	50
Ki67ssh	Pearson Correlation	,465**	1	,284*
	Sig. (2-tailed)	,001		,045
	N	50	50	50
Ki67ra	Pearson Correlation	,418**	,284*	1
	Sig. (2-tailed)	,003	,045	
	N	50	50	50

\*\* - висока статистичка значајност, \* - статистички значајна разлика,

ssh - спољашњи слушни ходник, ra - ретроаурикуларна регија

**Табела 15. Експресија Ki-67 у холестеатому (Ki-67hol), у кожи спољашњег слушног ходника (Ki-67ssh) и у кожи ретроаурикуларне регије (Ki-67ra). Постоји статистички значајна разлика у експресији Ki-67 у кожи спољашњег слушног ходника у односу на кожу ретроаурикуларне регије (0,284, P=0,045) и високо статистички значајна разлика у експресији Ki-67 у холестеатому у односу на дубоку кожу спољашњег слушног ходника (0,465, P=0,001) и кожу ретроаурикуларне регије (0,418, P=0,003).**



	COX2hol	COX2ssh	COX2ra
COX2hol Pearson Correlation	1	,593**	,481**
Sig. (2-tailed)		,001	,001
N	50	50	50
COX2ssh Pearson Correlation	,593**	1	,802**
Sig. (2-tailed)	,001		,001
N	50	50	50
COX2ra Pearson Correlation	,481**	,802**	1
Sig. (2-tailed)	,001	,001	
N	50	50	50

\*\* - висока статистичка значајност, ssh - спољашњи слушни ходник, ra - ретроаурикуларна регија

**Табела 16. *Pearson* – ова корелација експресије COX 2 у холестеатому (COX2hol), у кожи спољашњег слушног ходника (COX2ssh) и у кожи ретроаурикуларне регије (COXra). Постоји високо статистички значајна разлика у експресији COX 2 у холестеатому у односу на кожу спољашњег слушног ходника (0,593, P=0,001), и кожу ретроаурикуларне регије (0,481, P=0,001), као и високо статистички значајна разлика у експресији COX 2 у кожи спољашњег слушног ходника у односу на кожу ретроаурикуларне регије (0,802, P=0,001).**

		CD4hol	CD4ssh	CD4ra
CD4hol	Pearson Correlation	1	,479**	,455**
	Sig. (2-tailed)		,004	,007
	N	50	50	50
CD4ssh	Pearson Correlation	,479**	1	,835**
	Sig. (2-tailed)	,004		,000
	N	50	50	50
CD4ra	Pearson Correlation	,455**	,835**	1
	Sig. (2-tailed)	,007	,000	
	N	50	50	50

\*\* - висока статистичка значајност, ssh - спољашњи слушни ходник, ra - ретроаурикуларна регија

**Tabela17. Pearson - ова корелација кспресија CD4 лимфоцита у холестеатому (CD4hol), у кожи спољашњег слушног ходника (CD4ssh) и у кожи ретроаурикуларне регије (CD4ra). Постоји високо статистички значајна разлика у експресији CD4 лимфоцита у холестеатому у односу на кожу спољашњег слушног ходника (0,479, P=0,004) и кожу ретроаурикуларне регије (0,455, P=0,007), као и високо статистички значајна разлика у експресији CD4 лимфоцита у кожи спољашњег слушног ходника у односу на кожу ретроаурикуларне регије (0,835, P=0,000).**

		CD8hol	CD8ssh	CD8ra
CD8hol	Pearson Correlation	1	,442**	,467**
	Sig. (2-tailed)		,009	,005
	N	50	50	50
CD8ssh	Pearson Correlation	,442**	1	,842**
	Sig. (2-tailed)	,009		,001
	N	50	50	50
CD8ra	Pearson Correlation	,467**	,842**	1
	Sig. (2-tailed)	,005	,001	
	N	50	50	50

\*\* - висока статистичка значајност, ssh - спољашњи слушни ходник, ra - ретроаурикуларна регија

**Tabela18. Pearson – ова корелација експресије CD8 лимфоцита у холестеатому (CD8hol), у кожи спољашњег слушног ходника (CD8ssh) и у кожи ретроаурикуларне регије (CD8ra). Постоји високо статистички значајна разлика у експресији CD8 лимфоцита у холестеатому у односу на кожу спољашњег слушног ходника (0,479, P=0,004) и кожу ретроаурикуларне регије (0,455, P=0,007), као и високо статистички значајна разлика у експресији CD8 лимфоцита у кожи спољашњег слушног ходника у односу на кожу ретроаурикуларне регије (0,835, P=0,001).**

Међусобна корелација имунохистохемијских маркера одражава значај ћелијске пролиферације и инфламације у развоју холестеатома. Интересантно је понашање имунохистохемијских маркера у дубокој кожи спољашњег слушног ходника, која је у близини холестатома и која је везана за збивања у холестеатому. Показало се да постоји статистичка значајност за експресију CD4 лимфоцита у спољашњем слушном ходнику према свим клиничким карактеристикама стеченог холестеатома, односно да је експресија CD4 лимфоцита у спољашњем слушном ходнику већа у холестеатомима са тежом клиничком сликом, са већом коштаном деструкцијом, са присутном инфекцијом и са већом екстензивношћу холестеатомског процеса. Такође постоји статистички значајна

разлика експресије свих испитиваних маркера ћелијске пролиферације и инфламације у стеченом холестеатому у односу на налазе у кожи спољашњег слушног ходника. Да се та статистичка значајна разлика у експресији маркера ћелијске пролиферације и инфламације између узорака холестеатома и узорака коже спољашњег слушног ходника, одржава само у појединим групама испитаника разврстаних према клиничким карактеристикама холестеатома, показано је у табели 19.

Клиничке карактеристике холестеатома	Група испитаника	<i>Spearman</i> – ова корелација за експресију маркера у холестеатому и кожи спољашњег слушног ходника				
		PCNA	Ki-67	COX2	CD4	CD8
Степен коштане деструкције	А. већа	0,014*	0,011*	0,018*	0,011**	0,048*
	Б. мања	0,021*	0,088	0,231	0,312	0,628
Инфекција	Ц. присутна	0,009*	0,001**	0,008**	0,007**	0,017*
	Д. одсутна	0,059	0,240	0,081	0,061	0,150
Екстензивност холестатом. процеса	Е. већа	0,008**	0,003**	0,041*	0,001**	0,049*
	Ф. мања	0,001**	0,242	0,091	0,223	0,509

\*\* - висока статистичка значајност

\* - статистички значајна разлика

**Табела 19. Корелација експресије маркера ћелијске пролиферације и инфламације у холестеатому у односу на експресију маркера ћелијске пролиферације и инфламације у кожи спољашњег слушног ходника (*Spearman* – ова корелација)**

Колико је значајна међусобна побезаност маркера ћелијске пролиферације и инфламације у дубокој кожи звуковода и стеченом холестеатому средњег ува изражено је *Pearson* – овом корелацијом (табела 19). Постоји статистички значајна разлика у корелацији експресије PCNA ( $p=0,014$ ), експресије Ki-67 ( $p=0,011$ ), експресији COX2 ( $p=0,018$ ) и присуства CD4 лимфоцита ( $p=0,011$ ) и CD8 лимфоцита ( $p=0,048$ ) у дубокој кожи спољашњег слушног ходника и у холестеатому у А групи - групи испитаника са већим степеном коштане деструкције стеченог холестеатома (за корелацију експресије PCNA

такође и у Б групи - групи са мањим степеном коштане деструкције,  $p=0,021$ ). Постоји високо статистички значајна разлика у корелацији експресије свих маркера инфламације и пролиферације ( $p=0,009$  за PCNA,  $p=0,001$  за Ki-67,  $p=0,008$  за COX2 и  $p=0,007$  за CD4) и статистички значајна разлика за CD8 ( $p=0,017$ ) у дубокој кожи спољашњег слушног ходника и холестеатому, у Ц групи - групи испитаника са присутном инфекцијом. Нема такве статистичке значајности у Д групи испитаника без инфекције. Постоји високо статистички значајна разлика експресије маркера PCNA ( $p=0,008$ ), Ki-67 ( $p=0,003$ ) и CD4 ( $p=0,001$ ) и статистички значајна разлика у експресији маркера COX2 ( $p=0,041$ ) и CD8 ( $p=0,049$ ) у дубокој кожи спољашњег слушног ходника и у холестеатому у Е групи – групи испитаника са већом екстензивношћу холестеатомског процеса. Постоји високо статистички значајна разлика у експресији PCNA ( $p=0,001$ ) у дубокој кожи спољашњег слушног ходника и холестеатому у Ф групи - групи испитаника са мањом екстензивношћу холестеатомског процеса.

## 5. ДИСКУСИЈА

Стечени холестеатом средњег ува је хронична болест са претећим езгокранијалним и ендокранијалним компликацијама. Отогене компликације стеченог холестеатома се ретко јављају, али када се јаве постоји животна угроженост пацијента, код ендокранијалних отогених компликација је чест и летални исход. Хируршко лечење пацијената са стеченим холестеатомом средњег ува је једина терапијска опција, а подразумева хируршко уклањање холестеатома из простора средњег ува, где се налази спроводни апарат слуха, као и близак контакт са центром за слух и равнотежу у унутрашњем уву. Стечени холестеатоми се карактеришу рецидивирањем, што је неповољно и за хирурга и за пацијента. У прошлом веку операције ува су биле радикалније, па се рецидиви нису тако често јављали. Због конзервативних типова тимпаноластика уз очување функције слуха и равнотеже, рецидивантни и рекурентни холестеатоми су данас чешћи. Проналажење нехируршких и других метода лечења стеченог холестеатома су тесно везани за етиопатогенезу хроничног холестеатома, која је и даље непознаница. Решење се вероватно крије у што бољем познавању природе ове болести и сагледавању свих сегмената развоја стеченог холестеатома средњег ува: клиничких, патохистолошких, имунохистохемијских итд. што је и био циљ овог рада.

Испитујући 50 оперисаних пацијената са стеченим холестеатомом средњег ува уз дугогодишње отомикроскопско праћење истих преоперативно и постоперативно долази се до закључка да се ради о једном споро прогредирајућем хроничном процесу. Стечени холестеатом настаје уз поменуте предиспонирајуће факторе, развија се годинама и агресивну остеодеструктивну форму добија током пролонгиране инфламације. У нашој студији добили смо статистички значајно већу експресију CD4 Т лимфоцита у стеченим холестеатомима са тежом клиничком сликом, са већом коштаном деструкцијом, са присутном инфекцијом и са већом екстензивношћу холестеатомског процеса. Сличан резултат добили смо и за експресију CD4 Т лимфоцита у спољашњем слушном ходнику. CD8 Т лимфоцити нису показала такву дистрибуцију у стеченом холестеатому и кожи спољашњег слушног ходника као CD4 Т лимфоцити. CD8 Т лимфоцити се мање експримују од CD4 Т лимфоцита и у холестеатому и у околној кожи и вероватно је њихова

цитотоксичност од мањег значаја у имунолошким процесима у стеченом холестеатому са тежом клиничком сликом, па је и њихова дистрибуција и активност у различитим клиничким групама холестеатома подједнака. И други аутори су предност дали хуморалном имунолошком одговору у развоју стеченог холестеатома, који је уско везан за присуство Лангерхансових ћелија у стеченом холестеатому и повећано присуство CD4 Т лимфоцита <sup>(47, 48)</sup>. CD4 Т лимфоцити су били главни носиоци запаљенског инфилтрата у нашој студији и то посебно у упадљиво израженим запаљенским инфилтратима, каквих је било 67% међу испитаницама са инфекцијом. Поред дифузне инфилтрације периматрикса стеченог холестеатома CD4 Т лимфоцитима, лимфоцитни инфилтрати су доминантно били заступљени субепително у периматриксу, са могућношћу добре комуникације са матриксом холестеатома. Запаљенски инфилтрат је био статистички значајно већи у стеченим холестеатомима са присутном инфекцијом, што је и у ранијим радовима доказивано <sup>(82)</sup>. *Ma X.* и сарадници су једноставно показали да тежину клиничке слике стеченог холестеатома прати велики запаљенски инфилтрат у периматриксу, тако што су упоређивали места узорковања холестеатома. Највише изражену инфламацију су имали холестеатоми узорковани из гнојних, остеодеструктивних делова средњег ува <sup>(85)</sup>. Мања или већа инфламација може да објасни фенотипску разноликост холестеатома, али не и његово порекло <sup>(85)</sup>. *Ma X.* и сарадници су пронашли прекиде у грађи колагена IV у саставу базалне мембране. Испитујући ретракционе џепове, као прекурсоре холестеатома, *Shunyu* и сарадници су доказали да је прекид базалне мембране карактеристика холестеатома, а да није нађен прекид базалне мембране епитела ретракционог џепа. Иницијатор прекида базалне мембране у холестеатому је инфламација <sup>(46)</sup>. У нашој студији испитујући детаљно хистопатолошке налазе, нисмо нашли прекиде базалне мембране матрикса стеченог холестеатома.

За разлику од запаљенског инфилтрата у нашој студији, кератинизација је негативно корелирала са инфекцијом стеченог холестеатома, тако да је кератинизација била статистички значајно већа у холестеатомима без инфекције. Правилан луковичасти изглед адхерентних кератинских наслага у холестеатомима без инфекције, уз танки матрикс холестеатома, је типична патохистолошка слика споро растућег стеченог холестеатома без егзацербација инфекције (слике 9 и 13). Велике количине наслаганог кератина настале су захваљујући дуготрајном развоју холестеатома, а не повећаној пролиферацији

кератиноцита истањеног матрикса. Танки слојеви матрикса у холестеатомима са већом кератинизацијом, говоре у прилог проблема диференцијације кератонцита. Накупљање кератина у кератиноцитима и стварање корнеоцита, а затим и апоптоза корнеоцита догађа се у нижим, а не само у рожнатом слоју матрикса ових холестеатома (у 2 - 4 слоју), па је процес одвајања ламеларних слојева кератина и стварања луковица кератина, фенотипска карактеристика ових холестеатома. Постоји слабо изражена запаљенска инфилтрација у периматриксу ових холестеатома, што значи да је и вероватно слаба паракрина комуникација на релацији матрикс – периматрикс. Разлог убрзане матурације кератиноцита и поремећене диференцијације праћене апоптозом епителних ћелија треба тражити у интерцелуларним збивањима у матриксу или у физичким факторима типа притиска, ацидо-базном статусу, хипоксији итд <sup>(59)</sup>. Експресија маркера ћелијске пролиферације PCNA и Ki-67 на кератиноцитима у нашој студији није показала статистички значајну различитост према клиничким и патохистолошким карактеристикама стеченог холестеатома. Пролиферација ћелија матрикса холестеатома – кератиноцита битно се није разликовала у групама испитаника и са већом и са мањом коштаном деструкцијом, у групама испитаника са присутном/одсутном инфекцијом, и у групама испитаника са већом и мањом екстензивношћу холестеатома. Исти резултат је добијен поређењем експресије маркера ћелијске пролиферације према индексу кератинизације, према индексу запаљенског инфилтрата и индексу екстрацелуларног матрикса стеченог холестеатома. Кератинизација не корелира са пролиферацијом кератиноцита, већ вероватно са поремећеном диференцијацијом кератиноцита. Такви контраверзни наши резултати потврђују чињеницу уједначене пролиферације кератиноцита у матриксу током раста и развоја стеченог холестеатома. Резултати испитивања пролиферације кератиноцита уз помоћ експресије Ki-67 у стеченим холестеатомима код деце и одраслих, такође су контраверзни. *Bujia* и сарадници су показали да су дечији холестеатоми агресивније форме, *Welkoborsky*, *Sikka* и *Dornelles* да нема разлике у пролиферацији кератиноцита код дечијих и одраслих форми холестеатома, док су *Ashier* и сарадници ипак добили статистички већу експресију Ki-67 у холестеатомима одраслих у односу на дечије холестеатоме <sup>(36, 80, 81)</sup>. *Li* и сарадници су показали статистички значајно већу експресију Ki-67 у холестеатомима са израженом коштаном ерозијом <sup>(83)</sup>. *Sanli* и сарадници су показали да нема значајне разлике у



експресије Ki-67 у примарним стеченим холестеатомима и рекурентним холестеатомима<sup>(86)</sup>. Очекивану разлику експресије маркера ћелијске пролиферације, добили смо поредећи налазе у кожи са налазима у холестеатому сваког испитаника појединачно, што се показало очекиваним и слаже са налазима других аутора<sup>(34, 87, 88)</sup>. Пролиферација кератиноцита је значајно већа у кожи спољашњег слушног ходника него у ретроаурикуларној кожи, а такође пролиферација кератиноцита је значајно већа у матриксу холестеатома него у кожи спољашњег слушног ходника, анализирајући експресију PCNA и Ki-67. *Kim* и сарадници су експресијом цитокератина СК13 и СК16 у матриксу стеченог холестеатома, епителу бубне опне и епителу дубоке коже спољашњег слушног ходника показали сличност у пролиферацији кератиноцита, с тим што је степен пролиферације у корелацији са запаљенским процесом, који је изражен у холестеатому<sup>(43)</sup>. *Raunov* и сарадници су показали неселективност PCNA у условима присуства инфламираног инфилтрата и експресије само у S фази ћелијског циклуса, док се Ki-67 стабилно експримује преодминантно у базалним и супрабазалним слојевима холестеатома у свим фазама ћелијског циклуса, осим у мирној G<sub>0</sub> фази ћелијског циклуса<sup>(34)</sup>. У нашој студији добили смо идентичне резултате за експресију Ki-67 док је PCNA показао извесну неселективност и експримовао се у вишим слојевима матрикса холестеатома, односно и у супрабазалним слојевима коже спољашњег слушног ходника, иако се према другим ауторима експримовао само у базалној слоју епитела<sup>(34, 88, 89)</sup>.

Фокус нашег истраживања био је у анализирању имунолошких догађања на прелазу дубоке коже спољашњег слушног ходника у холестеатомски матрикс средњег ува. Испитивали смо маркере ћелијске пролиферације и инфламације у холестеатому и кожи спољашњег слушног ходника у свакој од шест група испитаника изоловано, разврстаних према клиничким карактеристикама. Корелација експресије маркера ћелијске пролиферације у холестеатому у односу на експресију маркера ћелијске пролиферације у кожи спољашњег слушног ходника је показала статистичку значајност за експресију Ki-67 у групама испитаника са већом коштаном деструкцијом, са присутном инфекцијом и са већом екстензивношћу холестеатомског процеса, док је експресија PCNA показала статистичку значајност у скоро свим групама испитаника разврстаних према клиничким карактеристикама холестеатома, осим у групи испитаника са одсутном инфекцијом. Униформнији налаз експресије PCNA у холестеатому и кожи спољашњег слушног

ходника према клиничким карактеристикама холестеатома, од налаза експресије Ki-67, је вероватно одраз неселективности PCNA као пролиферативног маркера. Агресивније клиничке форме испитиваних стечених холестеатома у нашој студији показују израженију међусобну повезаност PCNA и Ki-67 на релацији кожа спољашњег слушног ходника – матрикс холестеатома. У групи испитаника са већом коштаном деструкцијом, са присутном инфекцијом и са већом екстензивношћу холестеатома изражену пролиферацију у холестеатому прати и изражена пролиферација у кожи спољашњег слушног ходника. И другу аутори су показали да постоји концентрација пролиферативних маркера (СК 4, 5, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 18 и 19, PCNA, Ki-67, *peroxidase proliferator-activated receptor gamma* - PPAR- $\gamma$ , *cycline-dependent kinase inhibitor* - p27 итд.) у пределу фиброкартилагинозног анулуса спољашњег слушног ходника, посебно у доњим деловима тимпаничног анулуса<sup>(89, 90, 91)</sup>. Не постоји међусобно условљавање експресије PCNA и Ki-67, односно подударане у нивоу пролиферације епитела коже спољашњег слушног ходника и пролиферације холестеатомског матрикса у групи испитаника са одсутном инфекцијом у нашој студији. Инфективни агенс би према томе могао бити иницијатор за повећану пролиферацију епитела холестеатома и коже у близини холестеатома. У односу на инфламацију, према нашем истраживању, пролиферација кератиноцита није пресудни разлог настанка и развоја стеченог холестеатома, већ делује из другог плана. Иницијатор пролиферације може да буде ендотоксин из ћелијског зида бактерије, фрагменти кератинског дебриса, биофилм нпр. Скорија истраживања показују значајну улогу бактеријског биофилма који је идентификован као инфективни агенс и тригер у развоју хроничних гнојних упала средњег ува са холестеатомом<sup>(62)</sup>. Galli и сарадници су пронашли у 81,3% испитиваних холестеатома присуство инфективног биофилма у слојевима кератинског детритуса<sup>(92)</sup>. Скупине бактерија резистентне на антибиотике унутар биофилма су одговорне за рекурентне инфекције и хроничитет холестеатомског процеса, а кератинске насlage су одличан субстрат за пролонгирану инфекцију<sup>(62)</sup>. Rayner и сарадници су изоловали липополисахарид из биофилма, бактеријски продукт *Pseudomonas aeruginosa* – е, који индукује остеокластични развој „*in vitro*“, односно потенцијални је стимулус агресивности холестеатомског матрикса „*in vivo*“<sup>(93 - 95)</sup>. Међутим, Chole и сарадници су испитујући биофилм *Pseudomonas aeruginosa* – а у неколико „*in vitro*“ студија показали да биофилм није вирулентан<sup>(96, 97, 58, 63)</sup>. Вршено је испитивање акумулираног кератина

холестеатома на присуство микотичних узрочника инфекције и дошло се до резултата да у 89% испитиваних холестеатома постоји позитивна фунгална инфекција дерматофитног типа <sup>(98)</sup>.

Клиничка верификација инфекције стеченог холестеатома се доказује позитивним бактериолошким брисом. У нашој студији било је 72% холестеатома инфицирано појединачном или мешовитом бактеријском флором. Присуство бактеријског биофилма у акумулираном кератину може бити доказ притајене инфекције холестеатома у групи испитаника са негативним налазом бриса ува, којих је у нашој студији било 28%. Бактерије или гљивице унутар биофилма су резистентне и на антибиотике и на имунолошки одговор домаћина и доводе до стања хронично инфицираног холестеатома <sup>(94)</sup>.

Након иницијације матрикса холестеатома инфективним агенсом долази до активације пролиферације кератиноцита. Кератиноцити ослобађају проинфламаторне цитокине (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 итд.) који индукују фибробласте у периматриксу секретују одређене цитокине (KGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , EGF, PDGF итд.) <sup>(36)</sup>. Повратном спрегом фибробластни цитокини индукују пролиферацију, диференцијацију и миграцију кератиноцита у матриксу холестеатома <sup>(10)</sup>. Фибропластни EGF стимулише пролиферацију кератиноцита, при чему је EGFR појачано експримиран на мембрани кератиноцита (75% кератиноцита у матриксу холестеатома у односу на 10% кератиноцита епитела спољашњег слушног ходника, експримују EGFR) <sup>(30)</sup>. *Salil Nair* и сарадници су испитујући FGF (фибробластни фактор раста) и његов рецептор FGFR у ауралном полипу, показали укљученост ових цитокина у целуларну пролиферацију холестеатома удруженог са полипом <sup>(26)</sup>. FGF и FGFR су кључни цитокини у процесу зарастања ране, па се с правом јављају као фибробластни продукти у периматриксу холестеатома. Кератоцитна пролиферација и диференцијација су регулисане и аутокриним секрецијом TNF- $\alpha$  и TNF- $\beta$ , као и активацијом макрофага и мастоцита <sup>(10, 30)</sup>. Повећана продукција TNF- $\alpha$  делује на остеоκласну коштану ресорпцију, на стимулацију металопроотеиназа, колагеназа и секрецију простагландина Е од стране фибробласта, што води деструкцији меких ткива, као и у ресорпцију и инхибицију протеогликана у хрскавици <sup>(30)</sup>. Интеракција између кератиноцита у матриксу и фибробласта у периматриксу путем поменутих аутокриних и паракриних сигнала чини окосницу молекуларног патогенетског механизма у развоју

холестеатома<sup>(36)</sup>. Инфективни агенс иницира и поспешује ову хуморалну везу на релацији кератиноцити – фибробласти, што води ка агресивнијој фази у развоју стеченог холестеатома средњег ува и испољавања остеодеструкције холестеатома. Међутим, постоје и другачији ставови. *Vitale* и сарадници су испитујући експресију рецептора 2 тумор некротишућег фактора (TNF-R2) у стеченом холестеатому средњег ува показали да TNF-R2 није у директној корелацији са степеном инфламације<sup>(99)</sup>.

Екстензивност стеченог холестеатома средњег ува јесте у директној корелацији са растом холестеатома, односно са дужином трајања болести. Дугогодишњи стечени холестеатоми који захватају све пнеуматске просторе средњег ува, шире се даље и показују већи остеодеструктивни потенцијал него мање екстензивни холестеатоми, показало се у нашој студији.

Испитивањем патохистолошких карактеристика стеченог холестеатома показана је изразита хетерогеност грађе холестеатома, која корелира са стадијумом у развоју холестеатома. Хетерогена морфолошка слика стеченог холестеатома не показује децидно разлику у биолошком понашању холестеатома између различитих узорака. Наиме, патохистолошки налази стеченог холестеатома одражавају само један заустављени тренутак у развоју холестеатомског процеса. Резултате патохистолошког испитивања требало би зато коментарисати уз сагледавање времена када је узорковано ткиво и анатомског места из којег је узорковано ткиво. Очекивано је да узорак холестеатома у близини коштане деструкције, покаже повећан запаљенски инфилтрат у патохистолошкој слици<sup>(85)</sup>. Имунолошка дешавања у запаљенском инфилтрату периматрикса холестеатома су одговорна за остеодеструкцију. Запаљенски инфилтрат у стеченом холестеатому средњег ува је корелирао са развојем колагена у периметриксу у нашој студији. Колаген стварају фибробласти у периметриксу стеченог холестеатома као секвеле у завршним фазама запаљенског процеса<sup>(80)</sup>. Кератинизација у стеченом холестеатому средњег ува је мање изражена код повећаног запаљенског инфилтрата и код повећаног екстрацелуларног матрикса, односно колагена у нашој студији. Израженији запаљенски процес у периматриксу холестеатома доводи до појаве остеодеструктивних процеса у средњем ува. Клинички показатељ остеодеструкције је ерозија дугог крака инкуса, као најчешћег места прекида оскуларног ланца (72% испитаника са прекидом оскуларног ланца имали су деструкцију дугог крака инкуса у нашој студији), што одговара и налазима других аутора

<sup>(100)</sup>. Пријањање холестеатома на слушне кошчице неопходан услов за испољавање остеодеструктивног потенцијала холестеатома <sup>(59)</sup>. Најчешћи правац пружања стеченог холестеатома током раста у средњем уву је управо ка дугом краку инкуса. Само слушне кошчице које су у непосредном контакту са холестеатомом бивају узурирани, доказана је ултраструктурним испитивањем <sup>(101)</sup>. Промене на слушним кошчицама се манифестују ресорпцијом периосте и *Havers*-ових канала. Претпоставља се да притисак нагомиланих кератинских маса или присуство бактеријског биофилма у акумулираном кератину су могући окидачи остеодеструкције стеченог холестеатома. Изоловани случајеви прекида оскуларног ланца на нивоу дугог крака инкуса су испитаници код којих је дијагностикован стечени холестеатом још увек у почетној фази развоја холестеатома. Исти ти испитаници за неколико година имали би потпуно разорен оскуларни ланац, ако се не би оперисали одмах по дијагностиковању стеченог холестеатома, показује наша студија. С друге стране треба напоменути оскудну васкуларизацију дугог крака инкуса, која такође може употпунити слику овог за остеодеструкцију предиспонирајућег места <sup>(102</sup> - <sup>104)</sup>. Постепеним растом и напредовањем холестеатома у средњем уву, долази до његовог непосредног контакта са коштаном каналом фацијалног нерва и последичног огољавања фацијалног канала. Интересантно је да у односу на мекоткивну препреку (фацијални нерв или мембранозни лабиринт нпр.) стечени холестеатом драстично губи агресивни потенцијал. Само 1 од 6 дехисцентних фацијалних канала (17%) је имао знаке периферне парализе фацијалиса, а 1 од 5 деструисаних коштаних хоризонталних полукружних каналића (20%) је имао лезију мембранозног полукружног каналића, са клиничком сликом лабиринтитиса. Коштане лезије у темпоралној кости узроковане стеченим холестеатомом, показују прекиде континуитета периоста, са празним коштаном лакунама у коштаној грађи, неправилне цементне линије и одсуство неколагених протеина. Испитивањем коштаних структура у мастоидном наставку који нису у непосредном контакту са стеченим холестеатомом показују нормалну коштану грађу <sup>(105)</sup>. Све наведено алудира на повећану остеокластичну активност у тежим формама стеченог холестеатома.

До сличних резултата се дошло хипотезом мукоцилијарне тракције у етиопатогенези стеченог холестеатома, прокламоване од стране *Jackler* –а и сарадника. Према овој теорији иницијални догађај у етиопатогенези стеченог холестеатома је везан за спајање цилијарног кубоидног мукозног слоја бубне опне са мукозним покривачем на слушним

кошчицама. Због ниског ваздушног притиска у средњем уву долази до спајања два мукозна слоја у средњем уву и његове трансформације. Најчешће се то спајање одвија између парс флакциде или задње-горњег квадранта бубне опне (чији је мукоцилијарни транспорт проблематичан) и мукозног покривача дугог крака инкуса. Затим долази до блокаде цилија и ресорпције мукозних слојева, односно једноредних кубоидних епитела мукозе на појединим местима. Затим фиброзни слој и плочасто слојевити спољни слој бубне опне, директно налажу на периост слушне кошчице и отпочиње процес инфламације и остеокластичне активности уз коштану ерозију. Мукозна тракција омогућава даље ширење процеса у слободне просторе средњег ува, док накупине кератина са спољне стране бубне опне, такође поспешују даљи развој холестеатома. Пролиферација кератиноцита игра секундарну улогу у овој теорији настанка стеченог холестеатома. Тек наком инфламације под дејством затрепљеног муцина и паракриног дејства хуморалног имуног одговора у ламини проприји, долази до пролиферације кератиноцита експресијом EGFR. *Jackler* је пре свега квалитетима парс флакциде, која је еластичнија, савитљивија, чији мукозни слој садржи доста секреторних (*goblet*) и маст ћелија, а мање цилија него остали део бубне опне, као и затрепљеним мукозним покривачем у пределу атикотимпаничне дијафрагме покушао да укаже на иницијални механизам настанка стеченог холестеатома. Примарна цилијарна дискинезија и цистична фиброза били би пандам појави холестеатома у средњем уву према овој теорији. Међутим пацијенти оболели од поменутих болести имају мање секреторних ћелија у слузници што их штити од појаве холестеатома. *Jackler* протажира реконструкцију бубне опне и латералног зида атика хрскавицом код операције примарног стеченог холестеатома, јер слузница на хрскавици губи миграторну активност, па су зато рецидиви холестеатома ређи што је показано и у нашој студији (слика 6) <sup>(74)</sup>. Према становишту *Chole* – а и *Lim* - а не постоји цилијарни кубоидни епител у саставу бубне опне и на слушним кошчицама, већ је он присутан само око тимпаналног ушћа тубе као продужетак респираторног епитела из Еустахијеве тубе, што опавргава наведену теорију мукозне тракције <sup>(106)</sup>. Према становишту *Kuo* –а механизам настанка стеченог холестеатома мукозном тракцијом би значио да је сваки ретракциони џеп у адхезивном хроничном отитису (*otitis media chronica adhaesiva*) прекурсор холестеатома, а то се у пракси не догађа <sup>(107)</sup>. Само 25% пацијентата са хроничним адхезивним отитисом има пропагацију ка стеченом холестеатому <sup>(108)</sup>.

Свака од наведених теорија настанка стеченог холестеатома описује реалан етиопатогенетски механизам само под одређеним условима у средњем уву. И даље нема јединствене теорије настанка холестеатома која није условљена различитим предиспонирајућим факторима, већ се истражују мултифакторијални механизми који укључују екстрацелуларне и интрацелуларне сигнале каскадних имунолошких процеса развоја стеченог холестеатома.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

- Стечени холестеатоми средњег ува показју хетерогеност у клиничкој слици испитујући коштану деструкцију, присуство/одсуство инфекције и екстензивност холестеатомског процеса, као и хетерогеност у патохистолошким налазима, упоређујући степен кератинизације, степен запаљенског инфилтрата и степен пролиферације колагена.
- Индекс кератинизације стеченог холестеатома средњег ува је већи у одсуству инфекције.
- Индекс запаљенског инфилтрата стеченог холестеатома је већи у присуству инфекције.
- Индекс кератинизације стеченог холестеатома средњег ува је негативно корелирао са индексом запаљенског инфилтрата и индексом пролиферације екстрацелуларног матрикса, односно колагена. Запаљенски инфилтрат у стеченом холестеатому средњег ува је позитивно корелирао са развојем колагена у периметриксу.
- Експресија PCNA, Ki-67 и COX-2 и присуство CD4 и CD8 лимфоцита је највеће у стеченом холестеатому, затим у кожи спољашњег слушног ходника, а најмање је у ретроаурикуларној кожи.
- Експресија PCNA, Ki-67 и COX-2 и присуство CD8 лимфоцита је подједнако изражена у свим стеченим холестеатомима, без обзира на тежину клиничке слике, односно у групама холестеатома са већом/мањом коштаном деструкцијом, са већом/мањом екстензивношћу холестеатомског процеса и присутном/одсутном инфекцијом.
- Експресија CD4 лимфоцита у стеченом холестеатому и кожи спољашњег слушног ходника је израженија у холестеатомима са тежом клиничком сликом, односно са већом коштаном деструкцијом, са већом екстензивношћу холестеатомског процеса и присутном инфекцијом.
- Постоји позитивна корелација између маркера PCNA, Ki-67, COX-2, CD4 и CD8 лимфоцита у стеченом холестеатому средњег ува и маркера PCNA, Ki-67, COX-2, CD4 и CD8 лимфоцита у кожи спољашњег слушног ходника у групама испитаника са тежом клиничком сликом стеченог холестеатома.



## 7. ЛІТЕРАТУРА

1. Soldati D, Mudry A. *Knowledge about cholesteatoma, from the first description to the modern histopathology*. Otol Neurotol. 2001 Nov;22(6):723-30.
2. Kemppainen HO, Puhakka HJ, Laippala PJ, et al. *Epidemiology and aetiology of middle ear cholesteatoma*. Acta Otolaryngol. 1999;119(5):568-72.
3. Bento RF, Fonseca AC. *A brief history of mastoidectomy*. Int Arch Otorhinolaryngol. 2013 Apr;17(2):168-78.
4. Dankuc D. *History of otosurgery – The 20<sup>th</sup> century history of mastoid surgery and tympanoplasty*. Med Pregl. 2015 Mar-Apr;68(3-4):79-84.
5. Gray JD. *The chronic ear. The treatment of cholesteatoma in children*. Proc R Soc Med 1964;57:769-71.
6. Sade J. *Treatment of cholesteatoma and retraction pockets*. Eur Arch Otorhinolaryngol 1993;250:193-9.
7. Ching-Lung K, An-Suey S, Metthew Y, et al. *Updates and Knowledge Gaps in Cholesteatoma Research* BioMed Research International. 2015;854024(17)doi.org/10.1155/2015/854024
8. Kazahaya K, Potsic WP. *Congenital Cholesteatom*. Current opinion in otolaryngology Head Neck Surgery. 2004; 12: 398–403.
9. Thakkar KH, Djalilian HR, et al. *Congenital cholesteatoma isolated to the mastoid*. Otol Neurotol 2006; 27: 282–3.
10. Ching-Lung K. *Etiopathogenesis of acquired cholesteatoma: Prominent theories and recent advances in biomolecular researchs*. Laryngoscope, 2015;125:234-240.

11. Savić D, Ješić S, Jašović A, et al. *Holesteatom kavuma timpani izazvan osteomom mastoidnog nastavka*. Srp Arh celok.lek. 1987; 115: 609–14.
12. Yagoda MR, Selesnick SH. *Temporal bone fibrous dysplasia and cholesteatoma leading to the development of a parapharyngeal abscess*. J Laryngol Otol 1994; 108: 51–3.
13. Al Anazy FH. *Iatrogenic cholesteatoma in children with OME in a training program*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2006 Oct;70(10):1683-6.
14. Wolf M, Megirov L, Kronenberg J. *Multifocal cholesteatoma of the external auditory canal following blast injury*. Ann Otol Rhinol Laryngol 1999; 108: 269–70.
15. Goldfarb A, Gross M, Eliashar R, et al. *Middle cranial fossa cholesteatoma following blast trauma*. Ann Otol Rhinol Laryngol 2001; 110: 1084–6.
16. Naim R, Linthicum FH. *External auditory canal cholesteatoma*. Otol Neurotol 2004; 25: 412–3.
17. Rappaport JM, Browning S, Davis NL. *Intratympanic cholesteatoma*. J Otolaryngol 1999; 28 (6): 357–61.
18. Miyahara N, Fukushima N, Hirai T, et al. *Clinical Features of the Pediatric Acquired Cholesteatoma Based on the Staging Criteria for Cholesteatoma 2010 Japan*. Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho. 2016 Mar;119(3):181-6.
19. Somekawa Y, Nagashima T, Masaki T, et al. *A middle to long-term clinical study on pars flaccida and pars tensa cholesteatoma using survival analysis*. Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho. 2014 Dec;117(12):1448-56.
20. Hunter JB, Zuniga MG, Sweeney AD, et al. *Pediatric Endoscopic Cholesteatoma Surgery*.

Otolaryngol Head Neck Surg. 2016 Jun;154(6):1121-7. doi: 10.1177/0194599816631941. Epub 2016 Mar 1.

21. Baïke EV. *The comparative analysis of the clinical and morphological picture of the various forms of chronic suppurative otitis media*. Vestn Otorinolaringol. 2016;81(2):30-33.

22. Luers JC, Hüttenbrink KB. *Surgical anatomy and pathology of the middle ear*. J Anat. 2016 Feb;228(2):338-53.

23. Stieger C, Djerić D, Kompis M, et al. *Anatomical study of the human middle ear for the design of implantable hearing aids*. Auris Nasus Larynx. 2006 Dec;33(4):375-80.

24. Park J, Cheng JT, Ferguson D, et al. *Investigation of middle ear anatomy and function with combined video otoscopy-phase sensitive OCT*. Biomed Opt Express. 2016 Jan 5;7(2):238-50.

25. Tomlin J, Chang D, McCutcheon B, et al. *Surgical technique and recurrence in cholesteatoma: a meta-analysis*. Audiology & neuro-otology. 2013;18:135–142 .

26. Nair S, Watts S, Flood L. *Fibroblast growth factor receptor expression in aural polyps: predictor of cholesteatoma*. J Laryngol Otol 2004; 118: 338–42.

27. Arsović N, Radulović R, Jesić S, et al. *Surgery of cholesteatoma: surgical technique and cholesteatoma recurrences*. Acta Chir Iugosl. 2004;51(1):103-7.

28. Raynov A, Choung YH, Park HY, *Establishment and Characterization of an In Vitro Model for Cholesteatoma* Clin Exp Otorhinolaryngol. 2008 June; 1(2): 86–91

29. Svane-Cnudsen V, Sorensen LH, Rasmussen G, et al. *Cholesteatoma: a morphological study of stratum corneum lipids*. Acta Otolaryngol 2001: 121 (5): 602–6.

30. Maniu A, Harabagiu O, Perde Schrepler M, et al. *Molecular biology of cholesteatoma*. Rom J Morphol Embryol 2014;55:7–13.
31. Gurgel JDC, Ribeiro FSQ, Pereira CS, et al. *Immunohistochemistry of the External Auditory Canal: Systematic Review*. Intl. Arch. Otorhinolaryngol.v.12, n.2, p. 258-273, 2008.
32. Starborg M, Gell K, Brundell E, et al. *The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression*. J Cell Sci. 1996 Jan;109 ( Pt 1):143-53.
33. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, et al. *The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins*. J Cell Biol. 1993 Nov;123(3):513-22.
34. Raynov AM, Moon SK, Choung YH, et al. *Nucleoplasm staining patterns and cell cycle-associated expression of Ki-67 in middle ear cholesteatoma*. Am J Otolaryngol. 2005 Sep-Oct;26(5):296-301.
35. Ogino S, Kirkner GJ, Nosho K, et al. *Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer*. Clin Cancer Res. 2008;14:8221–8227.
36. Frickmann H, Zautner AE, *Cholesteatoma ? A Potential Consequence of Chronic Middle Ear Inflammation*. Otolaryngology 2012;10.417(2):2111-119.
37. Welkoborsky HJ. *Current concepts of the pathogenesis of acquired middle ear cholesteatoma*. Laryngorhinootologie. 2011 Jan;90(1):38-48; quiz 49-50. Epub 2011 Jan 10 .
38. Louw L. *Acquired cholesteatoma pathogenesis: stepwise explanations*. J Laryngol Otol. 2010 Jun;124(6):587-93.

39. Cinamon U1. *Passive and dynamic properties of the eustachian tube: quantitative studies in a model*. Otol Neurotol. 2004 Nov;25(6):1031-3.
40. Sadé J, Cinamon U, Seifert A. *Gas flow into and within the middle ear*. Otol Neurotol. 2004 Sep;25(5):649-52.
41. Cinamon U1, Russo E, Levy D. *Middle ear pressure change as a function of body position*. Laryngoscope. 2009 Feb;119(2):347-50.
42. Sudhoff H, Tos M. *Pathogenesis of attic cholesteatoma: clinical and immunohistochemical support for combination of retraction theory and proliferation theory*. Am J Otol 2000;21:786-92
43. Kim HJ, Tinling SP, Chole RA. *Increased proliferation and migration of epithelium in advancing experimental cholesteatomas*. Otol Neurotol 2002; 23: 840–4.
44. Huisman MA, De Heerb E, Grote JJ. *Terminal differentiation and mitogen – activated protein kinase signaling in human cholesteatoma epithelium*. Otol Neurotol 2006; 27: 422–6.
45. Ghanooni R, Decaestecker C, Simon P, et al. *Characterization of patterns of expression of protein kinase C - alpha, delta, ni, epsilon and eta and their correlations to p 53, galectin - 3, the retinoic acid receptor beta and the macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human cholesteatomas*. Hearing Research 2006; 214: 7–16.
46. Shunyu NB, Gupta SD, Thakar A, Sharma SC. *Histological and immunohistochemical study of pars tensa retraction pocket*. Otolaryngol Head Neck Surg. 2011 Oct;145(4):628-34
47. Liu L, Li Z, Hu M. *Langerhans cells and human aural cholesteatoma*. Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi. 1995;30(1):33-6.
48. Hussein MR, Sayed RH, Abu-Dief EE. *Immune cell profile in invasive cholesteatomas: preliminary findings*. Exp Mol Pathol. 2010 Apr;88(2):316-23.

49. Palko E, Poliska S, Csakanyi Z, et al. *The c-MYC protooncogene expression in cholesteatoma*. *Boimed Res Int*. 2014;2014:639896
50. Ecsedi S, Rakosy Z, Vizkeleti L, et al. *Chromosomal imbalances are associated with increased proliferation and might contribute to bone destruction in cholesteatoma*. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;139:635-640.
51. Erdoglijia M, Milanovic N, Colic M, et al. *E-cadherin expression in acquired cholesteatoma*. *B-ENT*. 2013;9(3):241-6.
52. Choung YH, Park K, Kang SO, et al. *Expression of the gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in human middle ear cholesteatoma*. *Acta Otolaryngol*. 2006;126:138–143.
53. Klenke C, Janowski S, Borck D, et al. *Identification of novel cholesteatoma-related gene expression signatures using full-genome microarrays*. *PLoS One*. 2012;7:e52718.
54. James AL, Chadha NK, Papsin BC, et al. *Pediatric cholesteatoma and variants in the gene encoding connexin 26*. *Laryngoscope*. 2010;120:183–187.
55. Friedland DR, Eernisse R, Erbe C, et al. *Cholesteatoma growth and proliferation: posttranscriptional regulation by microRNA- 21*. *Otol Neurotol*. 2009;30:998–1005.
56. Yoshikawa M, Kojima H, Yaguchi Y, et al. *Cholesteatoma fibroblasts promote epithelial cell proliferation through overexpression of epiregulin*. *PLoS One*. 2013;8:e66725.
57. Yetiser S, Satar B, Aydin N. et al. *Expression of epidermal growth factor, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1alpha in chronic otitis media with or without cholesteatoma*. *Otol Neurotol*. 2002;23:647–652.
58. Preciado DA. *Biology of cholesteatoma: special considerations in pediatric patients*. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2012;76:319–321.

59. Jackler RK, Santa Maria PL, Varsak YK, et al. *A new theory on the pathogenesis of acquired cholesteatoma: Mucosal traction*. The Laryngoscope. 2016;126(1):E48-E49.
60. Fukudome S, Wang C, Hamajima Y, et al. *Regulation of the angiogenesis of acquired middle ear cholesteatomas by inhibitor of DNA binding transcription factor*. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg. 2013;139:273–278.
61. Hamzei M, Ventriglia G, Hagnia M, et al. *Osteoclast stimulating and differentiating factors in human cholesteatoma*. The Laryngoscope. 2003 Mar;113(3):436-42.
62. Kaya E, Dag I, Incesulu A, Gurbuz MK, Acar M, Birdane L. *Investigation of the presence of biofilms in chronic suppurative otitis media, nonsuppurative otitis media, and chronic otitis media with cholesteatoma by scanning electron microscopy*. ScientificWorldJournal. 2013;2013:638715.
63. Chole RA, Faddis BT. *Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2002;128:1129–1133.
64. Baysal E, Aksoy N, Kara F, et al. *Oxidative stress in chronic otitis media*. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2013;270:1203–1208.
65. Rosito LP, da Silva MN, Selaimen FA, et al. *Characteristics of 419 patients with acquired middle ear cholesteatoma* Braz J Otorhinolaryngol. 2016;S1808-8694(16):30055-6.
66. Ricciardiello F, Cavaliere M, Mesolella M, et al. *Notes on the microbiology of cholesteatoma: clinical findings and treatment*. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2009 Aug; 29(4): 197–202.
67. Iqbal IZ, Watson C. *A study of mastoid pneumatisation and the presence of cholesteatoma in 393 patients*. J Laryngol Otol. 2016 Jan;130(1):66-8.

68. Songu M, Altay C, Onal K, et al. *Correlation of computed tomography, echo-planar diffusion-weighted magnetic resonance imaging and surgical outcomes in middle ear cholesteatoma*. Acta Otolaryngol. 2015 Aug;135(8):776-80.
69. Badran K, Ansari S, Al Sam R, et al. *Interpreting pre-operative mastoid computed tomography images: comparison between operating surgeon, radiologist and operative findings*. J Laryngol Otol. 2016 Jan;130(1):32-7.
70. Hu C, He G, Liang C. *Clinical analysis of otogenic extracranial and intracranial complications*. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 2015 May;29(10):903-5.
71. Migirov L, Weissburd S, Wolf M. *Mastoidectomy in the elderly*. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2010;72(2):80-3.
72. Dankuc D, Vlaški L, Pejaković N. *Techniques of the Tympanomastoidectomy with Reconstruction of the Posterior Bone Wall of the External Auditory Canal*. Srp Arh Celok Lek. 2015 Jul-Aug;143(7-8):480-6
73. Shao Y, Zhou Y, Li X, et al. *The lateral attic wall reconstruction with tragal cartilage and temporalis fascia graft*. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 2015 Nov;29(22):1981-4
74. Erdoglijia M, Milojevic M, Grgurevic U, et al. *Reconstruction of lateral attic wall in acquired cholesteatoma*. Vojnosanitetski pregled. 2016;doi:10.2298/vsp.150602155E [Epub ahead of print]
75. Harris AT, Mettias B, Lesser TH. *Pooled analysis of the evidence for open cavity, combined approach and reconstruction of the mastoid cavity in primary cholesteatoma surgery*. J Laryngol Otol. 2016 Mar;130(3):235-41.
76. Quaranta N, Taliente S, Coppola F, et al. *Cartilage ossiculoplasty in cholesteatoma surgery: hearing results and prognostic factors*. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2015 Oct;35(5):338-42



77. Borgstein J, Achbab S. *Simple ossicular chain reconstruction during ear surgery using tragal cartilage: A retrospective clinical study in thirty-one patients*. Clin Otolaryngol. 2016 Jan 23. doi: 10.1111/coa.12624. [Epub ahead of print]
78. Li L, Fan ZM, Han YC, et al. *Analyses of the factors relevant to revision tympanomastoid surgery*. Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 2016 May 7;51(5):333-7.
79. Goyal R, Mourya A, Qureshi S, et al. *Modified Radical Mastoidectomy with Type III Tympanoplasty: Revisited*. Indian J Otolaryngol Head Neck Surg. 2016 Mar;68(1):52-5.
80. Dornelles C, Meurer L, Selaimen S, et al. *Histologic description of acquired cholesteatomas: comparison between children and adults*. Rev Bras Otorrinolaringol. 2006;72(5):641-8.
81. Aslier M, Erdag TK, Sarioglu S, et al. *Analysis of histopathological aspects and bone destruction characteristics in acquired middle ear cholesteatoma of pediatric and adult patients*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2016 Mar;82:73-7.
82. Erdoglijia M, Milanovic N, Colic R, et al. *Middle ear cholesteatoma – correlation of histological, immunohistochemical and clinical characteristics*. MD-Medical Data 2014;6(4): 315-321
83. Li H, Jiang P, Wang L. *Immunohistochemical study of the epithelial hyperproliferation in middle ear cholesteatoma*. Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi. 2002 Apr;37(2):118-20.
84. Yamamoto-Fukuda T, Takahashi H, Koji T. *Expression of keratinocyte growth factor (KGF) and its receptor in a middle-ear cavity problem*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2012 Jan;76(1):76-81.
85. Ma X, Yu LS, Xia RM. *Immunohistochemical discrimination of aggressivity between the cholesteatoma from different positions*. Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 2006 Aug;41(8):574-8.

86. Sanli A, Tezer I, Paksoy M, et al. *Evaluation of Ki-67 expression in recurrent cases of cholesteatoma*. Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg. 2007;17(2):65-9.
87. Huismana MA, De Heerb E, Grotea JJ. *Sustained extracellular signal-regulated kinase1/2 mitogen-activated protein kinase signalling is related to increased p21 expression in cholesteatoma epithelium*. Acta Oto-Laryngologica. 2005;125(2):134-140.
88. Park K1, Park HJ, Chun YM. *Immunohistochemical study on proliferative activity of experimental cholesteatoma*. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2001 Mar;258(3):101-5.
89. Caliman e Gurgel JD, Pereira SB, Alves AL, et al . *Hyperproliferation markers in ear canal epidermis*. Braz J Otorhinolaryngol. 2010 Sep-Oct;76(5):667-71.
90. Bayazıt YA, Karakök M, Uçak R, et al. *Cycline-dependent kinase inhibitor, p27 (KIP1), is associated with cholesteatoma*. Laryngoscope. 2001 Jun;111(6):1037-41.
91. Hwang SJ1, Kang HJ, Song JJ, et al. *Up-regulation of peroxidase proliferator-activated receptor gamma in cholesteatoma*. Laryngoscope. 2006 Jan;116(1):58-61.
92. Galli J, Calò L, Giuliani M, et al. *Biofilm's Role in Chronic Cholesteatomatous Otitis Media: A Pilot Study*. Otolaryngol Head Neck Surg. 2016 May;154(5):914-6.
93. Rayner MG, Zhang Y, Gorry MC, et al. *Evidence of bacterial metabolic activity in culture-negative otitis media with effusion*. JAMA. 1998;279(4):296–299.
94. Bjarnsholt T. *The role of bacterial biofilms in chronic infections*. APMIS Suppl. 2013; 136:1–51.
95. Lampikoski H, Aarnisalo AA. *Mastoid biofilm in chronic otitis media*. Otol Neurotol. 2012; 33(5):785–788.

96. Chole RA, Gagnon PM, Vogel JP. *Inactivation of specific Pseudomonas aeruginosa biofilm factors does not alter virulence in infected cholesteatomas*. Otol Neurotol. 2014 Oct;35(9):1585-91.
97. Kao WT, Gagnon PM, Vogel JP, et al. *FleQ, a Transcriptional Activator, Is Required for Biofilm Formation In Vitro but Does Not Alter Virulence in a Cholesteatomas Model*. Otol Neurotol. 2016 Jun 1. [Epub ahead of print]
98. Effat KG, Madany NM. *Mycological study on cholesteatoma keratin obtained during primary mastoid surgery*. J Laryngol Otol. 2014 Oct;128(10):881-4.
99. Vitale RF, Pereira CSB, Alves AL, et al. *TNF-R2 expression in acquired middle ear cholesteatoma* Braz J Otorhinolaryngol. 2011;77(4):531-6.
100. Mohammadi G, Naderpour M, Mousaviagdas M. *Ossicular erosion in patients requiring surgery for cholesteatoma*. Iran J Otorhinolaryngol. 2012 Summer;24(68):125-8.
101. Shimada T, Lim DJ. *Distribution of ciliated cells in the human middle ear. Electron and light microscopic observations*. Ann Otol Rhinol Laryngol 1972;81:203–211.
102. Noussios G, Chouridis P, Kostretzis L, et al. *Morphological and Morphometrical Study of the Human Ossicular Chain: A Review of the Literature and a Meta-Analysis of Experience Over 50 Years*. J Clin Med Res. 2016 Feb;8(2):76-83.
103. Zhang J, Wen Z, Sun Y, et al. *Diagnosis and treatment of traumatic ossicular chain disruption and dislocation*. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 2012 Apr;26(7):300- 305.
104. Tóth M, Moser G, Rösch S, et al. *Anatomic parameters of the long process of incus for stapes surgery*. Otol Neurotol. 2013 Dec;34(9):1564-70.
105. Cinamon U, Kronenberg J, Benayahu D. *Structural changes and protein expression in the mastoid bone adjacent to cholesteatoma*. Laryngoscope. 2000 Jul;110(7):1198-203.

106. Chole RA, Lim DJ. *In reference to A new theory on the pathogenesis of acquired cholesteatoma: Mucosal traction*. Laryngoscope. 2016 Mar;126(3):E129-30.

107. Kuo CL. *In reference to A new theory on the pathogenesis of acquired cholesteatoma: mucosal traction*. Laryngoscope. 2016 Mar;126(3):E132.

108. Mansour S, Magnan J, Haidar H, et al. *Tympanic Membrane Retraction Pocket: Overview and Advances in Diagnosis and Management*. New York, NY: Springer; 2015.