

*Originalni članci/
Original articles*

HOLESTEATOM SREDNJEG UVA -
KORELACIJA HISTOPATOLOŠKIH,
IMUNOHISTOHEMIJSKIH I KLINIČKIH
KARAKTERISTIKA

MIDDLE EAR CHOLESTEATOMA-
CORRELATION OF HISTOLOGICAL,
IMMUNOHISTOCHEMICAL AND CLINICAL
CHARACTERISTICS

Correspondence to:

Dr Milan Erdogljija

ORL Klinika,
Vojnomedicinska akademija, Beograd
Ul. Crnotravska 17
11000 Beograd
Mob. tel. 0658316009
E-mail: milan.erdogljija@gmail.com

Milan Erdogljija¹, Nada Milanović¹, Miodrag Čolić²,
Milena Jović³

¹ ORL Klinika, Vojnomedicinska akademija, Beograd

² Institut za medicinska istraživanja, Vojnomedicinska akademija,
Beograd

³ Institut za patologiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd

Ključne reči

holesteatom, keratinizacija, imunohisto-
hemija, T limfociti, makrofagi, antigen
prezentujuće ćelije, Langerhansove
ćelije

Key words

cholesteatoma, keratinisation, immuno-
histochemistry, T lymphocytes,
macrophages, antigen presenting cells,
Langerhans cells

Sažetak

Cilj. Cilj našeg rada je bio uporediti histopatološke i imunohistohemijskih karakteristike holesteatoma između grupa ispitanika razvrstanih u odnosu na stepen koštane destrukcije, prisustvo /odsustvo infekcije i ekstenzivnost holesteatoma. **Metod.** Ispitivanje kliničkih, histopatoloških i imunohistohemijskih parametara smo obavljali na uzorcima holesteatoma 30 pacijenata koji su operisani zbog stečenog holesteatoma srednjeg uva. Od kliničkih karakteristika stečenog holesteatoma istraživali smo koštanu destrukciju, prisustvo /odsustvo infekcije i ekstenzivnost holesteatoma. Od histopatoloških karakteristika holesteatoma istraživali smo prisustvo keratina, zapaljenskog infiltrata i proliferaciju kolagena, a od imunohistohemijskih karakteristika holesteatoma ispitivali smo ekspresiju markera za CD4 limfocite, za makrofage i antigen prezentujuće ćelije, odnosno Langerhansove ćelije. Semikvantitativnom metodom izvršeno je stepenovanje pojedinih histopatoloških parametara. U statističkoj analizi podataka pored standardnih statističkih metoda aritmetičke sredine, standardne devijacije korišćen je T-test za nezavisne uzorke i Mann-Whitney U test. Za proučavanje međusobnih odnosa dve pojave korišćena je Spearmanova korelaciona analiza. **Rezultati.** Postoji visoko statistički značajno veće vrednosti u ukupnom broju CD4 T limfocita i makrofaga u holesteatomima sa većim stepenom koštane destrukcije. Prisustvo infekcije je negativno koreliralo sa indeksom keratinizacije, a pozitivno sa indeksom inflamatorne infiltracije, sa CD4 T ćelijskim imunim odgovorom, kao i ukupnim brojem makrofaga, dok nije uticalo na indeks proliferacije kolagena.

Zaključak. Ispitivanjem histopatoloških parametara i imunohistoloških parametara holesteatoma ukazali smo na njihovu povezanost sa nekim kliničkim manifestacijama ovog oboljenja kao što su koštana destrukcija, ekstenzivnost patološkog procesa i prisustvo infekcije, kao i heterogenost u morfološkoj slici i biološkom ponašanju ali i na različite stadijume u razvoju holesteatoma u vreme njegovog proučavanja.

UVOD

Holesteatom srednjeg uva predstavlja cističnu, benignu izraslinu ispunjenu keratinskim debrisom, koja pored destrukcije struktura srednjeg i unutrašnjeg uva i oštećenja slušne i vestibularne funkcije, može da dovede do egzokranijalnih i endokranijalnih komplikacija.

Hirurškim lečenjem, koje za sada predstavlja jedini terapijski postupak, ne može se uvek kompletno eradicirati holesteatom i prevenirati recidiv ovog oboljenja.

Mehanizmi nastanka i razvoja holesteatoma nisu dovoljno poznati zbog čega postoji potreba za njegovim izučavanjem naročito na molekularnom nivou. Postoji više aspekata izučavanja etiopatogeneze ovog oboljenja. Jedan

od njih uključuje proučavanje intracelularnih mehanizama signalizacije na nivou keratinocita u različitim ćelijskim fazama (proliferacija, diferencijacija, keratinizacija i apoptoza) (1). Drugi aspekt se odnosi na izučavanja anatomske i drugih morfoloških faktora mikrosredine srednjeg uva. Posebno se izučavaju fizički faktori (pritisak holesteatoma, vlaga i drugi uslovi mikrosredine spoljnog slušnog hodnika i srednjeg uva) na aktiviranje biohemijskih procesa koji se odvijaju intracelularno, pre svega na nivou keratinocita (2). Jedan od nivoa istraživanja su imunološki i genetski faktori.

U izučavanju imunoloških procesa istraživačima su na raspolaganju brojne metode kao što su histopatološke, imunohistohemijske i molekularno - biološke tehnike zasnovane na „in situ“ i „ex vivo“ analizi tkiva holesteatoma, kultura tkiva ili pojedinih ćelija izolovanih iz holesteatoma ali i proučavanja nastanka i razvoja oboljenja na različitim animalnim modelima (3, 4).

Razvijanjem novih tehnika, naročito imunohistohemijskih metoda kao i tehnika molekularne biologije omogućena su nova saznanja o patofiziologiji i patohistologiji holesteatoma (5). Imunohistohemijske tehnike predstavljaju vrlo podesne metodološke pristupe jer se zahvaljujući ogromnom spektru monoklonskih antitela jednostavno mogu identifikovati brojne ćelijske subpopulacije ali i proučavati ekspresiju različitih molekula uključenih u imunopatogenetska zbivanja (6). Primena ovih metoda na tkivnim presecima omogućava ne samo identifikaciju pojedinih ćelija ili molekula već i distribuciju analiziranih ćelija i njihovu komunikaciju sa susednim ćelijama kao i sa ćelijama ekstracelularnog matriksa. Takođe se sve promene u tkivu mogu kvantifikovati a samim tim i statističkim metodama obrađivati.

Na bazi takve ideje vodilje, naša istraživanja su bila usmerena na ispitivanje osnovnih histoloških karakteristika uzorkovanih holesteatoma a to su stepen keratinizacije, obim zapaljenskog infiltrata i stepen proliferacije ekstracelularnog matriksa, kao i prisustvo i distribucija CD4 T limfocita, makrofaga i Langerhansovih ćelija u holesteatomu.

Cilj našeg rada je bio uporediti histopatološke i imunohistohemijske karakteristike holesteatoma i utvrditi njihovu međusobnu povezanost u grupama ispitanika razvrstanih u odnosu na stepen koštane destrukcije, prisustvo /odsustvo infekcije i ekstenzivnost holesteatoma.

MATERIJAL I METODE

U studiju je uključeno 30 bolesnika sa stečenim holesteatomom srednjeg uva, kod kojih je učinjena operacija srednjeg uva u periodu 2005-2009. godine. Bila su zastupljena oba pola, starosti od 10 do 68 godina, od čega su sedmoro bila deca. Kod 19 bolesnika učinjena je timpanoplastika, od kojih je u 2 slučaja rađena retimpanoplastika. Kod ostalih 11 bolesnika je rađena radikalna timpanomastoidektomija, a u 2 od njih je rađena reoperacija.

Kliničke karakteristike holesteatoma su određene na osnovu otomikroskopskog i intraoperativnog nalaza. Prvu grupu (n = 16) su činili ispitanici sa destrukcijom susednih koštanih struktura, dok je druga grupa obuhvatala bolesnike bez destrukcije susednih koštanih struktura. U prvu grupu su razvrstani bolesnici koji su, osim razorenih slušnih košćica, imali i oštećenje zidova kavuma i mastoida (facijalni kanal, labirint, tegmen timpanuma ili antruma, denudiranost dure

ili sigmoidnog sinusa). Druga grupa (n = 14) je uključivala ispitanike bez ovih oštećenja ili je registrovana minimalna koštana destrukcija (npr. destrukcija dugog kraka inkusa ili dela maleusa).

Prisustvo bakterijske infekcije je procenjivano na osnovu nalaza brisa uva kao i otomikroskopskim i intraoperativnim nalazom prisustva sekreta, inflamiranog polipa i granulacija, vlažnog debrisa i macerirane kože spoljnog slušnog hodnika (6). Na osnovu ovih parametara ispitanici su razvrstani u grupu sa prisutnom infekcijom (n = 22). Grupu ispitanika sa holesteatomima bez infekcije (n = 8) su činili oni ispitanici sa holesteatomima u vidu suve perforacije u atiku ili u zadnjem gornjem kvadrantu sa prisutnim suvim holesteatomskim masama, suvim keratinom ili krustom.

Ekstenzivnost holesteatoma je procenjivana prema zahvaćenosti određenih regija srednjeg uva i mastoida (atik, zadnji timpanum, mezotimpanum, antrum, mastoid itd.). Na osnovu ovog parametra svi bolesnici su razvrstani u dve grupe. Prvu grupu (n = 20) su činili ispitanici sa više ekstenzivnim holesteatomima koji su zahvatili tri i više regiona srednjeg uva (npr. atik, antrum i mastoid ili atik, zadnji timpanum i mezotimpanum ili sve nabrojane regije). Drugu grupu (n = 10) su činili ispitanici sa manje ekstenzivnim holesteatomima koji su zahvatili do dva regiona srednjeg uva (npr. atik i antrum ili atik i zadnji timpanum).

Semikvantitativnom metodom izvršeno je stepenovanje pojedinih parametara kao što su naslage keratina, zapaljenski ćelijski infiltrat i proliferacija ekstracelularnog matriksa (kolagena). Izvršeno je bodovanje promena nakon čega je izračunavan odgovarajući indeks.

Indeks keratinizacije je procenjivan na sledeći način:

- 0 = odsustvo naslage keratina
- 1 = slabo izražene keratinske naslage
- 2 = umereno izražene keratinske naslage
- 3 = upadljivo izražene keratinske naslage

Indeks zapaljenskog infiltrata je procenjivan na sledeći način:

- 0 = odsutan ćelijski infiltrat
- 1 = slabo izražen ćelijski infiltrat (prosečno manje od 5 ćelija u jednom vidnom polju, uvećanje 40 x 10)
- 2 = umereno izražen ćelijski infiltrat (5-20 ćelija po jednom vidnom polju, uvećanje 40 x 10)
- 3 = upadljivo izražen ćelijski infiltrat (više od 20 ćelija po jednom vidnom polju, uvećanje 40 x 10)

Indeks proliferacije ekstracelularnog matriksa (kolagena) je određen na sledeći način:

- 0 = odsustvo kolagena
- 1 = slabo izražen kolagen
- 2 = umereno izražen kolagen
- 3 = upadljivo izražen kolagen

Imunohistohemijskim ispitivanjima je procenjivan ćelijski sastav i ekspresija pojedinih markera u tkivu holesteatoma. Bojenje tkivnih preseka je vršeno pomoću imunohistohemijskih metoda i to na parafinskim ili kriostatskim presecima. Detekcija antigena je vršena pomoću panela monoklonskih antitela. Sva antitela su bila mišji imunoglobulini. U radu su korišćena sledeća anti-humana antitela: anti - CD1a - antitelo (Dako), anti - CD4 - antitelo (Novocastra), anti - CD68 - antitelo (Dako) i anti - HLA - DR - antitelo (Serotec).

U statističkoj analizi podataka pored standardnih statističkih metoda aritmetičke sredine, standardne devijacije korišćen je T-test za nezavisne uzorke i Mann-Whitney U test. Za proučavanje međusobnih odnosa dve pojave korišćena je Spearmanova korelaciona analiza. Sve rezultate smo statistički obradili i gradirali na: statistički bez značaja ($p > 0,05$), statistički značajne ($0,05 > p > 0,01$), visoko statistički značajne ($0,01 > p > 0,005$) i veoma visoko statistički značajne ($p < 0,005$).

REZULTATI

U 16 od 30 holesteatoma (53,33%) bila je izražena keratinizacija koja se manifestovala prisustvom velikih naslaga keratina, slojevito raspoređenih i njihova eksfolijacija od većeg dela epitela. U ostalih 14 holesteatoma keratin je bio umeren ili slabo izražen i obično vezan za rožasti sloj epitela. Rezultati prikazani u tabeli 1. pokazuju da je prosečni indeks keratinizacije bio $2,10 \pm 0,77$. Pojedini holesteatomi su se sastojali od tankog epitela pri čemu su ćelije bile raspoređene u 3-4 sloja. Po pravilu u ovakvim holesteatomima keratinske naslage su bile najizraženije. U okviru histopatološke heterogenosti holesteatoma treba spomenuti prisustvo mikrocišta sa keratinom ili keratinskih perli u epidermisu. Izrazitu hiperplaziju epitela, pri čemu su na pojedinim mestima epitelne ćelije bile raspoređene u 10-12 slojeva, najčešće su pratili obimni zapaljenski infiltrati, lokalizovani subepitelno u lamini propriji (perimatriksu). Po pravilu, perimatriks je bio infiltrisan predominantno mononuklearnim ćelijama različitog broja i distribucije. Ćelije su bile retke, difuzno raspoređene pojedinačno ili u manjim grupicama oko sitnih krvnih sudova ili su bile raspoređene u obliku većih grozdolikih ili folikularnih struktura. Ćelijski agregati su bili najčešće lokalizovani subepitelno. Samo u nekim holesteatomima dominirali su granulociti. Prosečni indeks zapaljenskog infiltrata je bio $1,55 \pm 0,74$ (tabela 1). U pojedinim holesteatomima zapažen je karakterističan papilarni izgled perimatriksa zbog prisutnih plćih ili dubljih invaginacija epitela. U nekoliko holesteatoma zapažena je hiperplazija granularnog sloja. Holesteatomi su se razlikovali i u odnosu na stepen zastupljenosti ekstracelularnog matriksa. Prosečan indeks proliferacije kolagena je bio $1,31 \pm 0,60$ (tabela 1). U nekim holesteatomima bilo je upadljivo prisustvo mladog granulacionog tkiva ili delovi sluznice srednjeg uha.

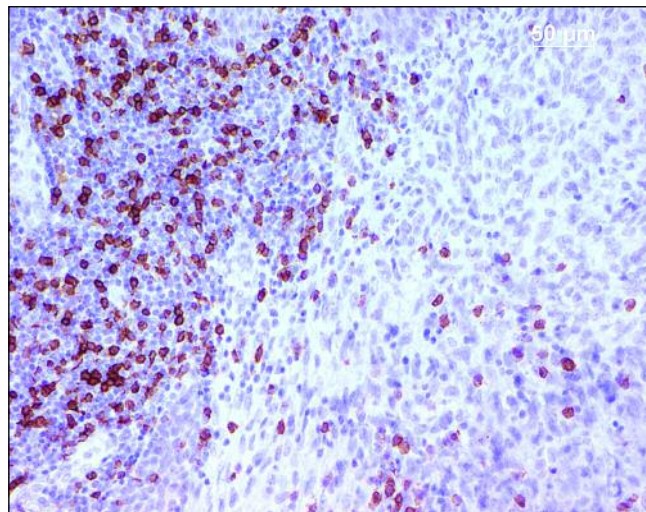
Tabela 1. Histopatološke karakteristike holesteatoma procenjene na osnovu semikvantitativne analize

Obeležje posmatranja	Indeks (srednja vr. \pm SD)	N
Keratinizacija	2.10 ± 0.77	30
Zapaljenski infiltrat	1.55 ± 0.74	30
Proliferacija kolagena	1.31 ± 0.60	30

Imunohistohemijske analize holesteatoma su pokazale celularni sastav inflamatornog infiltrata, kao i ekspresiju nekih od markera koji su ispoljeni na stromalnim ćelijama, a koji su značajni za imune i zapaljenske procese. Iz tehničkih razloga pojedina imunohistohemijska bojenja preparata nisu

uspela, pa je za pojednine parametre ukupan broj uzoraka (n) nešto manji od 30 ispitivanih.

CD4 marker je ispoljen predominantno na subpopulaciji pomoćničkih T limfocita i to u prosečnoj vrednosti $70,20 \pm 54,25$; $n = 29$. Samo retke CD4 ćelije su zapažene u matriksu, najčešće u bazalnom sloju epitela. Po pravilu ovakav imunohistološki nalaz se sretao kada je u perimatriksu u subepitelnom sloju bio prisutan veliki broj CD4 ćelija u limfocitnim infiltratima (slika 1).



Slika 1. Obimna infiltracija perimatriksa holesteatoma CD4+ ćelijama. U limfoidnim agregatima folikularnih karakteristika značajan broj limfocita je obojen CD4 monoklonskim antitelom.

Izvestan broj CD4 ćelija je imao karakteristike izduženih zvezdastih ćelija, dendritične morfologije ili krupnijih ćelija karakteristika makrofaga. Najčešće je ekspresija CD4 molekula na ovim ćelijama bila znatno slabija od ekspresije ovog markera na limfocitima. Pojedini histopatolški preseći holesteatoma na kojima su prikazani obimni infiltrati CD4 ćelija u obliku folikularnih struktura, nekoliko manjih infiltrata lokalizovanih perivaskularno u obilnom perimatriksu ili preseći sa retkim, pojedinačnim CD4 ćelijama najbolje ilustruju imunofenotipsku heterogenost holesteatoma.

Korišćenjem anti-HLA-DR monoklonskog antitela identifikovane su APC (antigen prezentujuće ćelije). Na osnovu morfoloških karakteristika HLA-DR ćelije su pokazivale karakteristike dendritičnih ćelija uključujući i intraepitelne Langerhansove ćelije, karakteristike makrofaga, ili limfocita. Najveći deo APC od njihovog ukupnog broja / mm^2 preseka tkiva ($93,43 \pm 50,68$; $n = 28$) je bio lokalizovan u subepitelnim zonama. U pojedinim zonama perimatriksa sa veoma diskretnim ili odsutnim ćelijskim infiltratom, zapažena je pojačana ekspresija HLA-DR markera na ćelijama dendritične morfologije. U matriksu HLA-DR ćelije su pokazivale tipične karakteristike dendritičnih, Langerhansovih ćelija i najbrojnije su bile u suprabazalnim slojevima. Međutim, pozitivne ćelije su identifikovane i između epitelnih ćelija bazalnog sloja, posebno na mestima guste mreže APC u subepitelnim zonama. Kvantitativnom analizom je nađeno da su intraepitelne HLA-DR ćelije činile $4,93 \pm 4,24$ % u odnosu na ukupne nukleisane ćelije epitelne zone (tabela 2).

CD68 predstavlja marker makrofaga. Rezultati prikazani u tabeli 2. pokazuju značajnu zastupljenost CD68+ ćelija u holesteatomu ($53,99 \pm 32,92$ ćelija / mm^2 ; $n = 29$). U matriksu

Tabela 2. Imunohistohemijske karakteristike holesteatoma

Markeri	Broj ćelija / mm ² (sr.vr. ± SD)	Procenat ćelija (%) u odnosu na ukupan broj epit.ćelija (sr.vr. ± SD)	Indeks / stepen ekspresije (sr.vr. ± SD)	n
CD4	70.20 ± 54.25	-	-	29
HLA-DR	93.43 ± 50.68	4.93 ± 4.2	-	28
CD68	53.99 ± 32.92	-	-	29
CD1a	-	4.63 ± 4.00	-	27

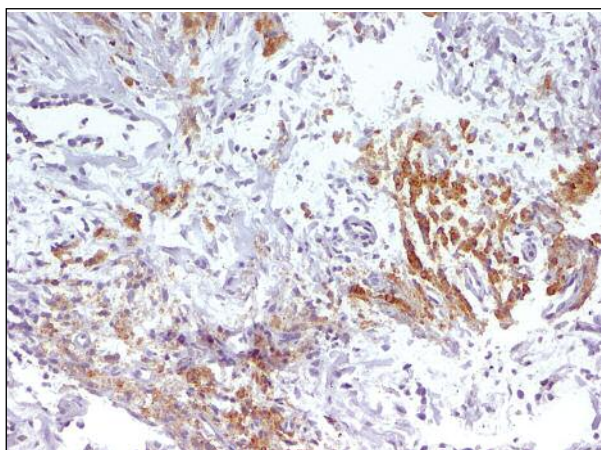
su su detektovane CD68⁺ ćelije samo u pojedinim holesteatomima tako da njihova analiza u ovom regionu nije posebno istraživana. Skoro svi makrofagi su bili lokalizovani u perimatriksu, difuzno ili u vidu manjih odnosno većih plaža ili klastera. Ove ćelije su bile dominantnije u fokalnim infiltratima, posebno onim sa predominacijom T limfocita.

Na slici 2 prikazana je tipična ekspresija CD68 molekula u perimatriksu holesteatoma koja takođe pokazuje različitu morfologiju CD68⁺ ćelija. U holesteatomu sa intenzivnom proliferacijom epitela, pseudo-tumorskih karakteristika, zapažen je značajan broj CD68⁺ ćelija infiltriranih između epitelnih ćelija.

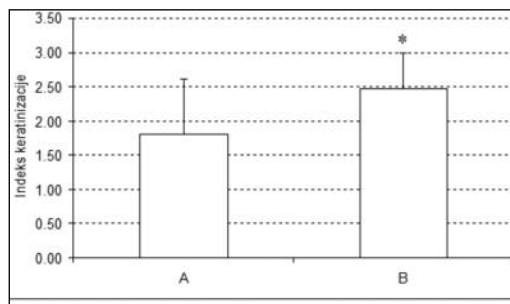
CD1a je marker subpopulacije dendritičnih ćelija, uključujući i Langerhansove intraepitelne dendritične ćelije. Analizom ekspresije CD1a molekula uočena je velika heterogenost holesteatoma u pogledu broja Langerhansovih ćelija. Najmanji broj CD1a⁺ ćelija je bio 0,6% a najveći 15,6% u odnosu na ukupan broj epitelnih ćelija. Tabela 2 pokazuje da su prosečne vrednosti CD1a⁺ ćelija iznosile 4,63 ± 4,00 % što je približno odgovara procentu intraepitelnih HLA-DR ćelija 4,93 ± 4,24 %. Na slici 3 prikazane su tipične morfološke i imunohistohemijske karakteristike Langerhansovih ćelija u hipertrofisanom epitelu matriksa.

Rezultati semikvantitativnih histopatoloških parametara su prikazani na grafikonima. Grafikon 1 pokazuje statistički značajno veće vrednosti indeksa keratinizacije (2,46 ± 0,52) u holesteatomima sa manjom destrukcijom (grupa B) u odnosu na holesteatome sa većom koštanom destrukcijom (grupa A - indeks keratinizacije 1,81 ± 0,81; p < 0,05).

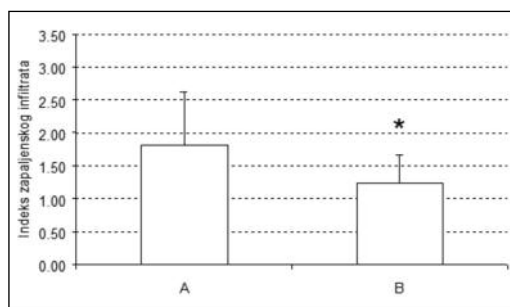
Suprotno ovom nalazu, stepen inflamatornih promena procenjen preko indeksa zapaljenskog infiltrata je bio statistički značajno manji (p < 0,05) u grupi B (1,23 ± 0,44) u odnosu na grupu A (1,81 ± 0,81) (grafikon 2).



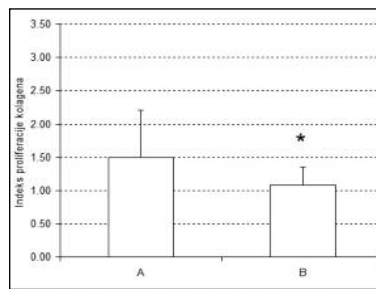
Slika 2. Tipična ekspresija CD68 molekula na makrofagima različite morfologije u holesteatomu sa izraženim perimatriksom

Grafikon 1. Poređenje indeksa keratinizacije između holesteatoma sa različitom koštanom destrukcijom

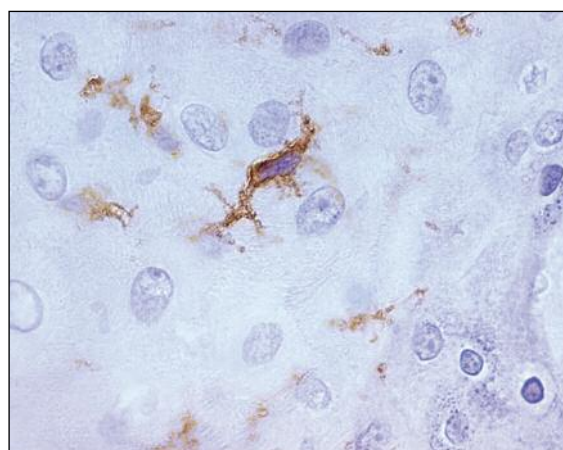
A: Grupa holesteatoma sa većom koštanom destrukcijom; n = 16
B: Grupa holesteatoma sa manjom koštanom destrukcijom; n = 14
*Statistički značajna razlika, p < 0.05

Grafikon 2. Poređenje indeksa zapaljenskog infiltrata između holesteatoma sa različitom koštanom destrukcijom

A: Grupa holesteatoma sa većom koštanom destrukcijom; n = 16
B: Grupa holesteatoma sa manjom koštanom destrukcijom; n = 14
*Statistički značajna razlika, p < 0.05

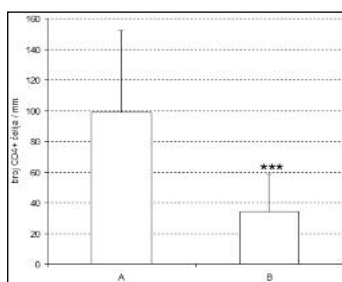
Grafikon 3. Poređenje indeksa proliferacije ekstracelularnog matriksa (kolagena) između holesteatoma sa različitom koštanom destrukcijom

A: Grupa holesteatoma sa većom koštanom destrukcijom; n = 16
B: Grupa holesteatoma sa manjom koštanom destrukcijom; n = 14
*Statistički značajna razlika, p < 0.05



Slika 3. Tipičan izgled intraepitelnih Langerhansovih ćelija u matriksu holesteatoma, dendritične morfologije

Grafikon 4. Poređenje broja CD4⁺ ćelija između holesteatoma sa različitom koštanom destrukcijom



A: Grupa holesteatoma sa većom koštanom destrukcijom; n = 16
 B: Grupa holesteatoma sa manjom koštanom destrukcijom; n = 14
 *Veoma visoko statistički značajna razlika p < 0,005

Takođe su promene u ekstracelularnom matriksu u grupi holesteatoma sa manjom koštanom destrukcijom, procenjivanje preko indeksa proliferacije ekstracelularnog matriksa (kolagena) ($1,08 \pm 0,28$) bile statistički značajno manje ($p < 0,05$) u odnosu na grupu holesteatoma sa većom koštanom destrukcijom ($1,50 \pm 0,71$) (grafikon 3).

Ukupan broj CD4⁺ T limfocita u tkivu holesteatoma grupe A ($99,26 \pm 53,23 / \text{mm}^2$) je bio veoma visoko statistički značajno ($p < 0,005$) veći u odnosu na broj ovih ćelija u holesteatomima grupe B ($34,43 \pm 24,05 / \text{mm}^2$) (grafikon 4).

Analizom ukupnih HLA-DR ćelija nisu nađene statistički značajne razlike između ispitivanih grupa ($104,26 \pm 45,74 / \text{mm}^2$ - grupa A; $78,99 \pm 53,50 / \text{mm}^2$ - grupa B). Takođe nisu nađene statistički značajne razlike ni u procentima intraepitelnih HLA-DR ćelija ($5,09 \pm 3,63$ % - grupa A; $4,72 \pm 4,98$ % - grupa B).

Broj makrofaga, definisan na osnovu ekspresije CD68 molekula, je bio visoko statistički značajno veći ($p < 0,01$) u grupi holesteatoma sa većom koštanom destrukcijom ($69,65 \pm 25,44 / \text{mm}^2$) u odnosu na holesteatome sa manjom koštanom destrukcijom ($4,72 \pm 4,98 / \text{mm}^2$).

Nisu uočene statistički značajne razlike ($p > 0,05$) između grupe A i grupe B holesteatoma u pogledu broja Langerhansovih (CD1a⁺) ćelija ($4,67 \pm 3,66$ % - grupa A; $4,59 \pm 4,55$ % - grupa B).

Na osnovu kliničkih karakteristika holesteatoma, uzimajući kao parametar infekciju, svi pacijenti su svrstani u dve grupe:

Grupa C: holesteatomi sa prisustvom infekcije; n = 22

Grupa D: holesteatomi bez prisustva infekcije; n = 8

Nakon odgovarajuće obrade podataka primenom Man-Whitney U testa dobijeni su sledeći ključni rezultati.

Rezultati prikazani u tabeli 3 pokazuju da je indeks keratinizacije negativno, a indeks inflamacije pozitivno kolerirao u odnosu na prisustvo infekcije, a da nije bilo bitnijih razlika u ispitivanju indeksa proliferacije kolagena između holesteatoma razvrstanih u odnosu na prisustvo / odsustvo infekcije.

Na osnovu kliničkih karakteristika holesteatoma, uzimajući kao parametar proširenost patološkog procesa, svi pacijenti su svrstani u dve grupe:

Tabela 3. Poređenje histopatoloških i imunohistohemijskih parametara u holesteatomima razvrstanih u odnosu na prisustvo / odsustvo infekcije

Markeri	Broj ćelija / mm ² (sr.vr. ± SD)	Procenat ćelija (%) u odnosu na ukupan broj epit.ćelija (sr.vr. ± SD)	Indeks / stepen ekspresije (sr.vr. ± SD)	n
Grupa C				
Indeks keratinizacije	-	-	2.00 ± 0.76	22
Indeks inflamacije	-	-	1.68 ± 0.78	22
Indeks prol. kolagena	-	-	1.32 ± 0.65	22
CD4	76.20 ± 60.16	-	-	22
HLA-DR	96.53 ± 53.35	4.66 ± 3.61	-	20
CD68	55.12 ± 32.99	-	-	21
CD1a	-	4.29 ± 3.47	-	19
Grupa D				
Indeks keratinizacije	-	-	2.43 ± 0.79	8
Indeks inflamacije	-	-	1.14 ± 0.38	8
Indeks prol. kolagena	-	-	1.29 ± 0.49	8
CD4	51.34 ± 22.79	-	-	7
HLA-DR	85.68 ± 45.64	5.63 ± 5.76	-	8
CD68	51.03 ± 34.81	-	-	8
CD1a	-	5.45 ± 5.22	-	8

Grupa C: Holesteatomi sa prisustvom infekcije

Grupa D: Holesteatomi sa odsustvom infekcije

Tabela 4. Poređenje histopatoloških i imunohistohemijskih parametara u holesteatomima razvrstanih u odnosu na ekstenzivnost patološkog procesa

Markeri	Broj ćelija / mm ² (sr.vr. ± SD)	Procenat ćelija (%) u odnosu na ukupan broj epit.ćelija (sr.vr. ± SD)	Indeks / stepen ekspresije (sr.vr. ± SD)	n
Grupa E				
Indeks keratinizacije	-	-	2.00 ± 0.79	20
Indeks inflamacije	-	-	1.70 ± 0.80	20
Indeks prol. kolagena	-	-	1.30 ± 0.57	20
CD4	76.04 ± 57.30	-	-	20
HLA-DR	90.05 ± 49.42	4.51 ± 3.74	-	19
CD68	58.22 ± 32.30	-	-	19
CD1a	-	4.14 ± 3.50	-	19
Grupa F				
Indeks keratinizacije	-	-	2.33 ± 0.71	10
Indeks inflamacije	-	-	1.22 ± 0.44	10
Indeks prol. kolagena	-	-	1.33 ± 0.71	10
CD4	57.22 ± 47.20	-	-	9
HLA-DR	100.56 ± 55.56	5.82 ± 5.27	-	9
CD68	45.96 ± 34.30	-	-	10
CD1a	-	5.80 ± 5.07	-	8

Grupa E: Holesteatomi sa većom proširenošću patološkog procesa

Grupa F: Holesteatomi sa manjom proširenošću patološkog procesa

Grupa E: holesteatomi sa većom ekstenzivnošću patološkog procesa; n = 20

Grupa F: holesteatomi sa manjom ekstenzivnošću patološkog procesa; n = 10

Nakon odgovarajuće obrade podataka primenom Man-Whitney U testa dobijeni su rezultati, koji pokazuju da nije bilo bitnijih razlika u ispitivanim ni histopatološkim ni imunohistohemijskim parametrima između holesteatoma razvrstanih u odnosu na stepen ekstenzivnosti patološkog procesa (tabela 4).

Rezultati ispitivanja korelacije između histopatoloških parametara (indeksa keratinizacije, indeksa zapaljenskog infiltrata i indeksa proliferacije ekstracelularnog matriksa) sa brojem (procentom) inflamatornih ćelija pokazuje veoma visoku statistički značajnu negativnu korelaciju između indeksa keratinizacije i broja CD4 limfocita ($p < 0,0001$) i makrofaga ($p < 0,0001$), a visoku statistički značajnu negativnu korelaciju između indeksa keratinizacije i ukupnih HLA-DR ćelija ($p < 0,01$). Nije nađena statistički značajna povezanost između indeksa keratinizacije i broja intraepitelnih HLA-DR ćelija ($p > 0,05$) i Langerhansovih CD1a⁺ ćelija ($p > 0,05$).

Međusobna povezanost između indeksa zapaljenskog infiltrata i imunohistohemijskih parametara pokazuje veoma visoku statistički značajnu pozitivnu korelaciju između indeksa zapaljenskog infiltrata i subpopulacije CD4 T limfocita ($p < 0,005$), a statistički značajnu sa brojem makrofaga ($p < 0,05$). Nije nađena statistička značajnost između indeksa zapaljenskog infiltrata i antigen-prezentujućih ćelija ($p > 0,05$).

Slična je situacija u korelaciji između indeksa proliferacije ekstracelularnog matriksa i imunohistohemijskih parametara. Postoji statistički značajna pozitivna korelacija između indeksa proliferacije kolagena i CD4 T limfocita ($p < 0,05$), kao i broja makrofaga ($p < 0,05$). Nije nađena statistički značajna razlika između indeksa proliferacije kolagena i antigen-prezentujućih ćelija ($p > 0,05$).

DISKUSIJA

U ovom radu kod 30 pacijenata operisanih od stečenog holesteatoma srednjeg uva analizirane su promene u matriksu i perimatriksu holesteatoma korišćenjem histopatoloških i imunohistohemijskih metoda i vršena njihova poređenja u odnosu na različite kliničke manifestacije bolesti. Ispitivanjem histopatoloških parametara - stepena keratinizacije, karakteristike epitelnih slojeva, obima i vrste zapaljenskog infiltrata i indeksa proliferacije ekstracelularnog matriksa i imunohistohemijskih parametara - prisustvo i distribucija različitih populacija ćelija u matriksu i perimatriksu holesteatoma, pokušali smo da ukažemo na njihovu povezanost sa nekim kliničkim manifestacijama ovog oboljenja kao što su koštana destrukcija, ekstenzivnost patološkog procesa i prisustvo infekcije.

Ispitivanjem histopatoloških karakteristika holesteatoma pokazana je heterogenost u morfološkoj slici što ukazuje na njihovo različito biološko ponašanje ali i na različiti stadijum u razvoju holesteatoma u vreme njegovog proučavanja. Međutim, samo na osnovu morfološke slike ne mogu se objasniti brojne heterogenosti. Pošto neki histopatološki na-

lazi odražavaju samo jedan vremenski period u razvoju stečenog holesteatoma kod dece i odraslih, rezultati ispitivanja treba analizirati zavisno od anatomskog mesta odakle je uzet uzorak kao i vremena kada je taj postupak vršen (7).

Histopatološka ispitivanja su omogućila analizu matriksa (broj i izgled keratinocita, distribuciju keratinocita po slojevima, debljinu epitelog sloja, obim i izgled keratinskih naslaga). Na osnovu opštih histoloških karakteristika nađena je izrazita heterogenost u debljini matriksa, a analizom karakteristika epitelnog sloja izrazita heterogenost u izgledu i broju keratinocita, kao i njihove distribucije po slojevima. U većem broju holesteatoma zapažena je izražena keratinizacija, odnosno hiperkeratinizacija, što je potvrđeno od mnogih autora (8, 9). Većina tih holesteatoma su imala tanji sloj matriksa. Klinički, kod ovakvih holesteatoma su bile najizraženije keratinske naslage. Histopatološkom analizom u trećini holesteatoma dokazana je hiperplazija holesteatomskog epitela, pri čemu su na pojedinim mestima ćelije bile raspoređene u 10-12 slojeva. U pojedinim holesteatomima sa izrazitom hiperplazijom epitelnih slojeva uočene su keratinske perle i mikrociste sa keratinom unutar matriksa. Izrazitu hiperplaziju epitela koja nastaje usled hiperproliferacije keratinocita najčešće su pratili obimni zapaljenski infiltrati u perimatriksu. Hiperproliferacija holesteatomskog epitela obično je bila udružena sa manjim stepenom keratinizacije. U jednom holesteatomu zapazili smo obimnu proliferaciju holesteatomskog epitela koja je formirala pseudotumorsku leziju sa mitozama patološkog izgleda. Mnogi radovi su objavljeni bazirani prvenstveno na proliferativnim markerima u matriksu holesteatoma, kakvi su PTEN, ID1, CILD i dr. (8, 9, 10, 11, 12). Naročito su značajna poređena ekspresije proliferativnih markera kože spoljašnjeg slušnog hodnika sa njihovim prisustvom u holesteatomu, jer su takva istraživanja bazična u pogledu objašnjavanja etiologije holesteatoma zbog čega ga s pravom za holesteatom kaže da je „koža na pogrešnom mestu“ (9).

Dobijeni rezultati imunohistohemijskog istraživanja u ovom radu tek treba da se dalje razrađuju i daju smernice u etiopatogenezi holesteatoma. Ispitujući ekspresiju imunih ćelija u holesteatomu, kakve su T limfociti, makrofagi i Langerhansove ćelije, pokušali smo da utvrdimo kako i koliko inflamatorna komponenta ima ulogu u razvoju holesteatoma. Pojačana imunološka aktivnost ispitivanih markera je naročito bila razvijena u holesteatomima sa težom kliničkom slikom sa ekstenzivnim, više destruktivnim holesteatomom i prisutnom infekcijom što se slaže sa istraživanjima iz literature (12, 13, 14). Količina imunih ćelija i njihova distribucija u holesteatomu može da pomogne u razjašnjenju patogeneze holesteatoma upoređujući ih sa patohistološkim i kliničkim karakteristikama holesteatoma.

ZAKLJUČAK

1. Postoje visoko statistički značajno veće vrednosti u ukupnom broju CD4 T limfocita i makrofaga u holeratomima sa većim stepenom koštane destrukcije
2. Ne postoji statistički značajna razlika prisustva Langerhansovih ćelija prema i jednom parametru kliničke slike holeratoma
3. Prisustvo infekcije je negativno koreliralo sa indeksom keratinizacije, a pozitivno sa indeksom inflamatorne

infiltracije, dok nije uticalo na indeks proliferacije kolagena

4. Prisustvo infekcije pozitivno korelira sa CD4 T ćelijama imunim odgovorom, kao i ukupnim brojem makrofaga

5. Na ekstenzivnost holeratomskog procesa ne utiču ispitivane histopatološke i imunohistohemijske karakteristike holeratoma

Abstract

Objectives. The aim of this study was to correlate histological and immunohistochemical characteristics of cholesteatoma according to some clinical characteristics of cholesteatoma as bone destruction, presence of infection or cholesteatoma extension.

Methods. We investigated clinical, histological and immunohistochemical characteristics of cholesteatoma in 30 samples from operated patients with acquired middle ear cholesteatomas. We classified all samples according to their clinical characteristics of cholesteatoma as bone destruction, presence of infection or cholesteatoma extension and histological characteristics of cholesteatoma as keratinisation, inflammatory process and extra cells matrix proliferation. Expression of CD4 lymphocytes, macrophages and antigen presenting cells, mostly Langerhans cells we investigated according to immunohistochemical characteristics of cholesteatoma. A semi quantitative method was used to determine the level of some histological characteristic. We used independent group T-test and Mann-Whitney U test to analyze statistical results, besides that we used standard statistical methods of arithmetical average. Spearman correlation analysis has been used to establish correlation between two characteristics of cholesteatoma.

Results. Expression of CD4 T lymphocytes and macrophages in cholesteatoma with more bone destruction is highly statistically significant then in cholesteatoma with less bone destruction. There is a negative correlation between presence of infection and keratinisation, but positive correlation between presence of infection and inflammatory process and CD4 T cells immune response and total number of macrophages. Presence of infection have no influence on extra cells matrix proliferation.

Conclusion. Researching histological and immunohistochemical characteristics of cholesteatoma we dedicate their correlation with some clinical manifestations of cholesteatoma as a bone destruction, presence of infection or cholesteatoma extension. We found so many diversity in biological behavior through very different levels of cholesteatoma development.

LITERATURA

1. Welkoborsky HJ. Current concepts of the pathogenesis of acquired middle ear cholesteatoma. *Laryngorhinootologie*. 2011;90(1):38-48.
2. Cinamon U, Kronenberg J, Benayahu D. Structural changes and protein expression in the mastoid bone adjacent to cholesteatoma. *The Laryngoscope*. 2009;110(7):1198-203.
3. Raynov AM, Choung YH, Park HY, Choi SJ, Park K. Establishment and characterization of an in vitro model for cholesteatoma. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2008;1(2):86-91.
4. Caliman JD, Ribeiro FAQ, Pereira CS, Alves AL. Immunohistochemistry of the external auditory canal: systematic review. *Intl Arch Otorhinolaryngol*. 2008;12(2): 258-73.
5. Shunyu NB, Gupta SD, Thakar A, Sharma SC. Histological and immunohistochemical study of pars tensa retraction pocket. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;145(4):628-34.
6. Erdogljija M, Milanovic N, Colic M, Jovic M. E-cadherin expression in acquired cholesteatoma. *B-ENT*. 2013;(9):241-6.
7. Welkoborsky HJ, Jacob RS, Hinni ML. Comparative analysis of the epithelium stroma interaction of acquired middle ear cholesteatoma in children and adults. *Eur Arc Otorhinolaryngol*. 2007;264(8):841-8.
8. Mun SK, Hwang JY, Kim JH, Cho HS, Lee GH. R445 – Expression of proliferative markers in cholesteatoma. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2008;139(1):193-4.
9. Caliman JD, Pereira CSB, Alves AL, Ribeiro FQ. Hyperproliferation markers in ear canal epidermis. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76(5):193-204.
10. Yune TY, Byun JY. Expression of PTEN and phosphorylated. Akt in human cholesteatoma epithelium. *Acta Otolaryngol*. 2009;129(5):501-6.
11. Park Q, Zhang A, Hamajima Y, Zhang Q, Lin J. Identification of Id1 in acquired middle ear cholesteatoma. *Archives Otolaryngol*. 2008;134(3):306-10.
12. Byun JY, Yune TY, Lee JY, Yeo SG, Park MS. Expression of CYLD and NF-kappaB in human cholesteatoma epithelium. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:796315.
13. Takahashi S, Nakano Y. Immunohistochemical demonstration of Langerhans' cells in cholesteatoma using an anti-serum against S-100 protein. *Arch Otorhinolaryngol*. 1989;246(1):48-52.
14. Hussein MR, Saved RH, Abu-Dief EE. Immune cell profile in invasive cholesteatomas: preliminary findings. *Exp Mol Pathol*. 2010;88(2):316-23.

■ Rad je primljen 13.08.2014. Prihvaćen 13.10.2014.