

**KOLESTEATOM HÜCRE KÜLTÜRÜNDE DİKLOFENAK  
SODYUM VE 5-FLUOURASIL'IN ETKİSİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Program Kodu: 3001**

**Proje No: 216S961**

Proje Yürütücüsü:  
**Dr.Öğr.Üye.Ahmet KARA**

Araştırmacı:

Prof.Dr.Mehmet Güven

Doç.Dr.Yusufhan Yazır

Doç.Dr.mahmut Sinan Yılmaz

Bursiyer:

Ayşegül Açıksarı

Aralık 2018

SAKARYA



## ÖNSÖZ

Kolesteatom dokusu, keratinize çok katlı yassı epitelin normalde olmaması gereken orta kulak boşluğu veya temporal kemiğin diğer pnömotize bölgelerindeki birikimidir. Histolojik olarak benign olmasına rağmen klinik gidişi destrüktif olan bir hastalıktır. Kolesteatom ile ilgili ülkemizde yapılan epidemiyolojik veriler yetersiz olup bu hastalığın insidansı toplumlar arasında farklılıklar göstermektedir. Yapılan çalışmalarda bu oranın 100.000 kişide 3 ile 12.6 arasında değiştiği bildirilmiştir. Günümüzde tek kesin tedavisi cerrahi olan bu hastalıkta tüm uğraşlara rağmen hastalığa bağlı komplikasyonlar ve nüksler halen görülmektedir. 3001 projeleri kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenen bu çalışmanın sonucunda kolesteatom üzerine etkinliği kanıtlanan diklofenak sodyumun yeni çalışmalar ile ototoksik ve nörotoksik etkilerinin de araştırılmasından sonra topikal formu da olan bu molekülün klinik kullanıma girmesi mümkündür. Yine günümüzde otolojik cerrahilerde tampon amacıyla kullanılan emilebilir orta kulak materyallerine bu molekül farklı dozlarda uygulanarak yeni ticari ürünler elde edilebilir.

## İÇİNDEKİLER

1. Tablo ve Şekil Listeleri.....	iii
2.Özet.....	iv
3.Abstract.....	v
4.Giriş.....	1
5.Literatür Özeti.....	2
6.Gereç ve Yöntem.....	5
6.1.Deney Grupları.....	5
6.2.Kolesteatom Dokusunun Cerrahi Yolla Elde Edilmesi.....	5
6.3.Keratinosit İzolasyon, Kültür ve Karakterizasyon Çalışmaları.....	5
6.4.Fibroblast İzolasyonu ve Kültürü.....	7
6.5.Hücrelerin Tabaka Halinde Elde Edilmesi .....	8
6.6.Hücre Canlılık, Proliferasyon ve Apoptozis Analizleri.....	10
6.6.1.WST-1 Testi.....	10
6.6.2. Hücrelerinin Apoptoz Deneyi.....	10
6.6.3. İn-Vitroda Elde Edilen Koloestatom Dokusunun İmmünoflorasan İncelemesi .....	10
7.Bulgular.....	11
7.1.WST-1 Testi.....	11
7.2.Hücrelerinin Apoptoz Deneyi.....	12
7.3.İN-Vitroda Elde Edilen Koloestatom Dokusunun İmmünoflorasan İncelemesi .....	13
8.Tartışma/Sonuç.....	15
9.KAYNAKLAR LSTESİ Ve ATIFLAR.....	19

## TABLO ve ŞEKİL LİSTELERİ

<b>Şekil 1:</b> Kolesteatom dokusunun otokrin ve parakrin regülasyon mekanizmalarını özetleyen sistematik modeli.....	3
<b>Şekil 2:</b> Kolesteatom dokusundan elde edilen küçük doku parçaları petri kabına ekilerek gerçekleştirilen explant kültür işleminin zıt-faz mikroskopik görüntüleri. ....	6
<b>Şekil 3:</b> Kolesteatom dokusundan elde edilen keratinositlerin kültürdeki zıt-faz mikroskopik görünüşleri.....	6
<b>Şekil 4:</b> Kolesteatom dokusundan elde edilen keratinositlerin karakterizasyonu için belirlenen belirteçlerin immunofloresan işaretleme ile analizi.....	7
<b>Şekil 5:</b> Kolesteatom dokusundan elde edilen fibroblastların kültürdeki zıt-faz mikroskopik görünüşleri .....	7
<b>Şekil 6:</b> Kolesteatom dokusundan elde edilen fibroblastların karakterizasyonu için belirlenen belirteçlerin immunofloresan işaretleme ile analizi.....	8
<b>Şekil 7:</b> Fibroblast ve keratinositlerin tabaka halinde elde edildiği görülmektedir.....	9
<b>Şekil 8:</b> Elde edilen fibroblast tabakalarının kültür kabının yüzeyine tekrar tutunması için bir saat 37°C lik inkübatörde bekletildikten sonraki görüntüleri .....	9
<b>Şekil 9:</b> Elde edilmiş keratinosit tabakası fibroblast tabakasının üzerine konularak 3 boyutlu kolesteatom modeli oluşturulmuştur .....	9
<b>Şekil 10:</b> Kontrol grubu, %1 lik Diklofenak Na ve %1 lik 5-FU gruplarının 1, 3, 6 ve 12 .saat çoğalma ve canlılık kapasitesinin WST-1 analizi ile karşılaştırılması. ....	11
<b>Şekil 11:</b> Kontrol grubu, %1 lik Diklofenak Na ve %1 lik 5-FU gruplarının 1, 3, 6 ve 12 .saat Apoptoz düzeylerinin karşılaştırılması Annexin V analizi ile karşılaştırılması.....	12
<b>Şekil 12:</b> Fibroblast ve keratinosit hücre tabakalarının üst üste getirilmesiyle elde edilen üç boyutlu kolesteatom dokusunun Vimentin ve İnvolutrin ile IF boyanma görüntüleri. ....	13
<b>Şekil 13:</b> Fibroblast ve keratinosit hücre tabakalarının üst üste getirilmesiyle elde edilen 3 boyutlu kolesteatom dokusunun Desmin ve CK16 ile immunofloresan boyama görüntüleri...	14
<b>Şekil 14:</b> 3 boyutlu kolesteatom dokusunun anti caspase 3 ile immunofloresan boyama görüntüleri.....	14
<b>Şekil 15:</b> 3 boyutlu kolesteatom dokusunun anti caspase 3 ile immunofloresan boyama görüntüleri .....	15
<b>Tablo 1:</b> %1 ve %2 lik DS uygulamaların canlılık ve apoptoz üzerine etkilerinin karşılaştırılması.....	12

## 2. ÖZET

**Giriş:** İnvaziv ve destrüktif özellikleri olmasına rağmen benign bir hastalık olan kolesteatoma kronik otit mediaya bağlı komplikasyon oranlarının artışından ve yüksek rekürrens oranlarından sorumludur. Bilinen tek etkin tedavi yöntemi cerrahi eksizyon olan bu hastalıkta medikal tedavi alternatiflerinin tespiti, hastalığın tedavi algoritmasına yeni bakış açıları oluşturabilir.

**Yöntemler:** Hücre kültürü için gerekli olan kolesteatom dokuları kliniğimizde opere edilen ve çalışma için doku vermeyi kabul eden dört farklı hastadan elde edildi. Ardından elde edilen keratinosit ve fibroblast hücreleri sıcaklık duyarlı kültür kaplarında üç boyutlu kolesteatom modelini oluşturmak için birlikte kültüre edildi ve bu model üzerinde %1 ve %2 lik diklofenak sodyum dozları canlılık ve hücre çoğalma oranları açılarından WST-1 ve annexin-V testleri ile incelendi.

**Bulgular:** Çalışma sonuçlarında % 1 lik diklofenak sodyum grubunda negatif ve pozitif kontrol gruplarına göre canlılık, proliferasyon değerlerinin daha düşük, apoptoz düzeylerinin ise istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü.

**Sonuç:** Çalışmamızla birlikte literatürde ilk kez hücre tabakaları kullanılarak oluşturulan üç boyutlu kolesteatom deney modeli ile diklofenak sodyumun kolesteatom üzerine etkinliği gösterildi. Ototoksik ve nörotoksik etkilerin çalışılması sonrasında bu molekül kolesteatom üzerinde kullanılabilir.

**Anahtar kelimeler:** Kolesteatom, primer hücre kültürü, diklofenak, 5-Florourasil

### 3. ABSTRACT

**Introduction:** Middle ear cholesteatoma is a benign disease with invasive and destructive clinical behaviors. It increases the rate of both chronic otitis media complications and revision surgeries. To find medical treatment alternatives for this disease, which is the only known effective treatment method is surgical excision, may create new treatment alternatives for the algorithm of the disease.

**Materials and Methods:** The cholesteatoma tissues required for cell culture were excised from four different participants who were operated on in our clinic and agreed to give tissue for the study. Cholesteatoma derived keratinocytes and fibroblasts were then co-cultured in temperature sensitive culture dishes to make a three-dimensional cholesteatoma model. After that, the effect of 1% and 2% diclofenac sodium on viability and cell proliferation rates was examined by using WST-1 and annexin-V tests.

**Results:** Upon examining the results of our study, cell viability and proliferation rates were found to be lower and apoptosis rates were higher in the DS group versus the negative and positive control groups.

**Conclusion:** Within the present study, we described a new three-dimensional cholesteatoma cell culture model developed by using cell sheet technology and we demonstrated the efficacy of diclofenac sodium on cholesteatoma for the first time in the literature. After subsequent studies that investigate the ototoxic and neurotoxic effects of this molecule, it could possibly be used in patients with chronic otitis media with cholesteatoma.

**Keywords:** Cholesteatoma, Primary Cell Culture, Diclophenac, 5-Fluorouracil





#### 4. GİRİŞ

Kolesteatom dokusu, keratinize çok katlı yassı epitelin normalde olmaması gereken orta kulak boşluğu veya temporal kemiğin diğer pnömotize bölgelerindeki birikimidir. Histolojik olarak benign olmasına rağmen klinik gidişi destrüktif olan bir hastalıktır. 1838 yılında Alman fizyolojist Johannes Muller, bu hastalık için ilk defa kolesteatom terimini kullanmış olup bu lezyonun kolesterin ve yağ içeren bir tümör olduğunu belirtmiştir. Ancak bugün bilinen gerçek görüş ise kolesteatom dokusunun içerisinde kolesterol içermediği ve gerçek bir tümör özelliği göstermediği yönündedir. Buna rağmen alışlagelmiş bu terim halen kullanılmaktadır. 1850 yılında Toynebee, 1853'de Virchow, 1868'de Von Troeltsch, 1880 de Bezold kolesteatom ile ilgili çeşitli tanımlamalar yapmıştır. 1993 yılında ise Strunk tarafından bu doku günümüzde de kabul edildiği şekilde yanlış yerde bulunan deri olarak tanımlanmıştır (1). Ancak kolesteatom dokusu; ter bezleri ve diğer deri ekleri, damar ve sinir sonlanmaları gibi normal dermal dokunun komponentlerini içermemektedir. Deri ile olan tek benzerliği çok katlı yassı epitele sahip olmasıdır ki kolesteatom dokusundaki bu yassı epitelin normal cilde göre çok daha hiperproliferatif özellikler gösterdiği de bilinmektedir (2).

Kolesteatom ile ilgili yapılan epidemiyolojik veriler incelendiğinde Nager ve arkadaşlarının 12.000 kronik otit medialı hastayı incelediği bir çalışmada bu grubun 1/3 ünde kolesteatom dokusunu tespit ettiği raporlanmıştır. Yine bu hastalık nedeni ile endikasyon bulan kişi sayısı yılda 100.000 de 66 olarak bildirilmiştir (3). Tos' un yaptığı başka bir çalışmada bu oran 100.000 kişide 3 çocuk ve 12.6 erişkin hasta olarak tespit edilmiştir (4). Yine Kemppainen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Finlandiya'da kolesteatom insidansı 100.000 de 9.2 olarak tespit edilmiştir (5).

Kolesteatom patolojisine günümüz otolojik tedavi yaklaşımı cerrahi yöntemlerle hastalıklı dokunun tümüyle eksizyonu şeklinde olmasına rağmen, kolesteatom eradikasyonunun tümüyle yapılamadığı durumlarda alternatif veya cerrahiye ek yöntemler gerekli olabilmektedir. Nitekim hastalık nüks oranları bu gerekliliği açıkça ortaya koymaktadır (6,8). Bu konudaki çalışmalarda deneysel hayvan modelleri oluşturulsa da bu tür çalışmalardaki standardizasyon sorunları hem etkin madde tespitinde hem de ilaç dozlaması yapılması sırasında sorunlara yol açabilmektedir. Bu noktada başka bir deneysel model olan hücre kültürü teknikleri karşımıza çıkmaktadır. Hücre kültürü tekniklerinde hastalıklar laboratuvar ortamında hücreler aracılığı ile taklit edilmekte ve bu hücreler üzerlerinde yapılan deneysel incelemelerin standardizasyonu hayvan deneylerine kıyasla daha iyi olabilmektedir.

Bu çalışma ile hücre tabakaları kullanılarak üç boyutlu kolesteatom modeli literatürde ilk kez oluşturulmuştur. Yine diklofenak sodyumun kolesteatom üzerine etkisi literatürde ilk kez incelenmiştir.

## 5. LİTERATÜR ÖZETİ

Kolesteatom cerrahisi hastalığın şiddeti, tutulum yeri ve yaygınlığına bağlı olarak; pekçok farklı yaklaşım ile opere edilebilir. Ancak tüm yöntemlerde geçerli olan temel cerrahi prensip, kolesteatomun germinatif tabakası olan matriks dokusunun tümüyle eksize edilmesidir. Ancak ne yazık ki; her olguda bu dokunun tümüyle eksizyonu önemli yapılarla olan ilişkileri veya cerrahi görüş kısıtlılıkları nedeniyle mümkün olamayabilmektedir. Kolesteatom dokusunun tümüyle temizlenememesi durumunda ise hastalık nüks etmekte ve bu nedenle revizyon cerrahi gereksinimleri olabilmektedir. Bu konuda yapılmış çalışmalar incelendiğinde revizyon oranlarının dış kulak yolunun korunduğu vakalarda daha yüksek olmakla birlikte, açık kavite timpanomastoidektomilerde dahi rekürrens kolesteatom oranlarının %17 lere kadar ulaştığı görülmektedir. Kanal wall up timpanomastoidektomilerde bu oranın % 70 lere kadar ulaştığı görülebilir (6-8).

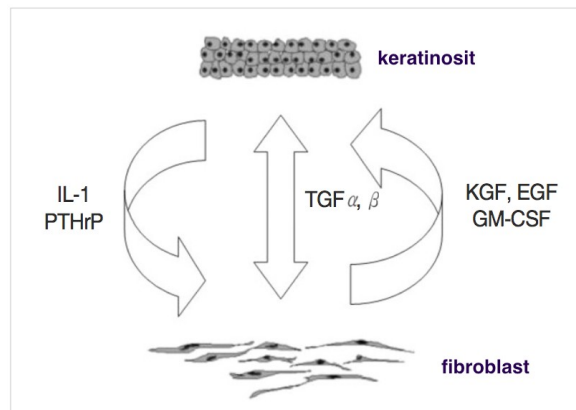
Kolesteatom dokusu ile ilgili çalışmalarda kullanılabilecek deneysel modeller arasında in-vivo deney hayvan modelleri ve in-vitro hücre temelli modeller bulunmaktadır. İn-vivo olarak kullanılan modeller arasında 1) orta kulağa propilen glikol (9) veya dimetil-benzantransin (10) enjeksiyonları, 2) deneklerin dış kulak yolunun ligasyonu (11), 3) orta kulağa cilt transferi (12) gibi yöntemler kullanılmaktadır. İn-vivo yöntemler günümüzde halen kullanılmakla birlikte bu tür tekniklerle yapılan çalışmalarda; deneklerin anatomik, hormonal ve immun özellikleri gibi deneklere bağlı faktörler veya deney aşamalarındaki hem modelleme hem de histolojik doku eldesinde çalışan araştırmacılara ait faktörler gibi objektifliği etkileyebilen nedenler bulunmaktadır.

Kolesteatomun medikal tedavisi konusunda hücre kültürü ile yapılmış çalışma oldukça kısıtlıdır. Bu konudaki Minotti ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptığı bir çalışmada all trans retinoik asidin kolesteatom hücrelerinin migrasyonu üzerine etkisi araştırılmış ve bu molekülün migrasyonu geçici olarak önlediği gösterilmiştir (13). Yine 2000 yılında Kountakis ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada bir kalsiyum kanal blokeri olan verapamilin etkisi çalışılmış ve kolesteatom hücrelerinin migrasyonu geri dönüşümsüz bir şekilde önlenmiştir (14). Bu konuda çalışılan bir başka molekül ise 5-Fluourasil molekülüdür ki bu ilaç çeşitli hayvan çalışmalarında kullanılarak kolesteatom üzerine etkisi kanıtlanmıştır (15, 16). 5-Fluourasil, timidilat sentazı hedef alan bir pirimidin analogu olup, özellikle mitotik aktivitesi yüksek hücrelerde DNA sentezini inhibe ederek etki göstermektedir. Topikal formu in situ bazal hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom, keratoakantom ve aktinik keratoz gibi cilt lezyonlarında kullanılmaktadır (17). Hızlı çoğalan hücrelerin ihtiyacı olan tiyamini taklit ederek hücre içine alınan ve metabolize edildiğinde hücreye toksik olarak ölümüne sebep

olan bir moleküldür (18). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda etkisinin bir tümör süpresör gen olan p53 te mutasyona neden olması sayesinde de oluştuğu bildirilmiştir (19). 5-Fluourasil grubu çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak kullanılacaktır.

Diklofenak sodyum, skuamoz hücreli karsinom için prekanseröz bir lezyon olup keratinositlerin intraepitelyal proliferasyonu olan aktinik keratoz hastalığında günümüzde kullanım alanı bulmaktadır. Bu ilacın, yassı epitel hücrelerinin anormal proliferasyonu olan kolesteatom dokusunda da etkili olabileceği düşünülmüştür. İlacın lokal kullanıma uygun krem formunun bulunması da çalışmamızda kullanılabilmesinin yanında klinik kullanıma da kolaylıkla adapte edilebilmesini sağlayabileceğinden önemlidir.(22,23)

Kolesteatom dokusundaki fibroblast ve keratinosit hücre gruplarının birlikte bulunmasının hücre-hücre etkileşimi ile kolesteatom patofizyolojisinde önemli olduğu bilinmektedir. Kolesteatom dokusunun perimatriks dokusuna karşılık olan fibroblast kaynaklı olduğu kanıtlanmış pek çok biyomolekül bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak verilebilecek keratinosit büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, granulosit-makrofaj koloni stimulan faktör ve epiregulin gibi biyomoleküllerin kolesteatomun matriks dokusuna karşılık gelen keratinositlerin aktivasyonuna ve hiperproliferasyonuna neden olduğu bilinmektedir (2, 24,25). Yine bu moleküllerin salınımı açısından fibroblast aktivasyonuna neden olan interlökin-1 $\alpha$ , interlökin-1 $\beta$  ve paratiroid hormon ilişkili protein gibi moleküllerin keratinosit kaynaklı olduğu da literatürde tanımlanmıştır (26,27). Bu biyomoleküllerin etkileşimi ile ilgili sistematik bir özet şema literatürde Alexander ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (2) (şekil 2). Bu bilgiler dahilinde çalışmamızda keratinosit ve fibroblast kaynaklı hücre tabakalarının birlikte kokültürü ile elde edilen hücre gruplarının kullanılması planlanmıştır.



**Şekil 1:** Kolesteatom dokusunun otokrin ve parakrin regülasyon mekanizmalarını özetleyen sistemik modeli. (IL: interlökin; PTHrP: paratiroid hormon ilişkili protein; TGF: transforme edici büyüme faktörü; KGF: keratinosit büyüme faktörü; EGF: epidermal büyüme faktörü; GM-CSF: granulosit-makrofaj koloni stimulan faktör)

Doku oluşumunda en son yaklaşım, hücreleri tek tek kullanmak yerine, in vivo ortamdakini taklit etmek amacıyla “hücre tabakalarını” kullanarak doku oluşturmaktır. Bilindiği gibi, vücudumuzdaki organların tümü erken embriyonik dönemdeki üç farklı hücre tabakasının gelişimiyle oluşmuştur: endoderm, mezoderm ve ektoderm. Organ oluşumunda bu üç tabaka birbiriyle etkileşim halindedir. İlk olarak, Tokyo Kadınlar Tıp Üniversitesi’nden Okano ve grubu tarafından 2004 yılında öne sürülen “hücre tabaka mühendisliği”nin temeli de, yukarıdaki bu kuramsal bilgiye dayanmaktadır (28,29). Doku hücrelerinin bir malzemeyle etkileşiminde üç durum söz konusudur. Bunlardan ilki, hücrelerin yüzeyle etkileşmediği, böylece hücre yapışmasının ve üremesinin gerçekleşmediği durumdur. Böyle malzemeler doku üretiminde kullanılamaz. İkincisi, malzemeyle hücreler arasında fizikokimyasal etkileşimlerin olduğu ve bunun sonucunda da “geri dönüşümlü hücre yapışmasının (pasif yapışma)” gerçekleştiği durumdur. Son tür etkileşimse “aktif hücre yapışması”dır. Pasif yapışma sonrasında gerçekleşen bu olayda, hücreler malzeme yüzeyine yapışır, yayılır ve ürerler (29). Bu yüzeylerden hücreleri koparmak için, tripsin ve dispaz gibi protein zincirlerini kıran (proteolitik) enzimler kullanmak gerekir. Bu enzimler, hücre adezyon/yapışma moleküllerini ve hücreler arasındaki matriksi (ekstrasellüler matriks:ESM) hücrelerden ayırırlar. Sonuç olarak, bu işlem sonrasında hücreler tek tek elde edilir. Tabaka halinde hücre üretebilmek için ise araştırmacılar proteolitik enzimleri kullanmadan hücreleri malzeme yüzeyinden kaldıracabilecek yöntemleri aramışlar ve sıcaklık-duyarlı polimerlerin özelliklerini bu yönde kullanmanın mümkün olabileceğini göstermişlerdir.

Biyolojik ortamda parçalanıp yok olan “biyo-bozunur polimerler” birinci nesil doku mühendisliği için anahtar rol oynarken, ikinci nesil doku mühendisliği için, hücrelerin tabaka halinde üretimini sağlayan “sıcaklık-duyarlı polimerler” anahtar rol oynamaktadır. Araştırma sonuçlarına göre, sıcaklık-duyarlı polimerler arasında en çok poli(N-izopropil akrilamid) tercih edilmiştir. Poli (N-izopropil akrilamid), en düşük kritik çözünme sıcaklığı (LCST) olan 32°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda, yapısındaki suyu kaybederek büzülür. 32°C’nin altındaki sıcaklıklardaysa yapısına tekrar su alarak şişme özelliği gösterir. Okano ve grubu çalışmalarında, bu teknolojiyi kullanarak, polistiren doku kültür kaplarının yüzeyini poli(N-izopropilakrilamid) ile kaplamışlardır. 20 nanometre kalınlıktaki bu polimer tabakası, ortam sıcaklığında değiştirilmesiyle hücrelerin kap yüzeyine yapışmasına ve yüzeyden kopmasına izin vermiştir (30).

Şu ana kadar hücre tabakaları; kornea oluşturulması amacıyla (31), diş çevresindeki periodontin hastalıklarında (32), üriner mukoza rejenerasyonunda (33) kullanılmıştır. İki boyutlu hücre tabakasıyla yapılan çalışmalara ek olarak, üç boyutlu hücre tabakalarının ele alındığı kalp dokusu mühendisliği de başarıyla uygulanmış durumdadır (34). Şu ana kadar

sadece tedavi amaçlı kullanılan hücre tabakaları çalışmamızda ilk kez bir deneysel bir model oluşturma amacıyla kullanılmıştır.

## **6. GEREÇ ve YÖNTEM**

Araştırma protokolü ile ilgili etik kurul onayı Kocaeli Üniversitesi girişimsel olmayan klinik çalışmalar etik komitesinden alınmıştır.

### **6.1. Deney Grupları**

Çalışmamızdaki 3 farklı deney grubu oluşturuldu.

**Grup 1. Diklofenak sodium (DS) uygulama grubu:** Çalışma grubu olarak belirlenen bu grubun kolesteatom hücre kültürüne %2 ve %1 lik diklofenak sodium dozları uygulandı ve sitotoksik etkiler araştırıldı.

**Grup 2. 5-Fluourasil (5-FU) uygulama grubu:** Pozitif kontrol grubu olarak belirlenen bu grubun kolesteatom hücre kültürüne % 2 ve %1 lik 5-Fluourasil dozları uygulandı ve sitotoksik etkiler araştırıldı.

**Grup 3. Negatif kontrol grubu:** Bu grubun kolesteatom hücre kültürüne herhangi bir ek ilaç eklemeyerek standart besiyerinde deney süresince negatif kontrol grubu olarak incelenecektir.

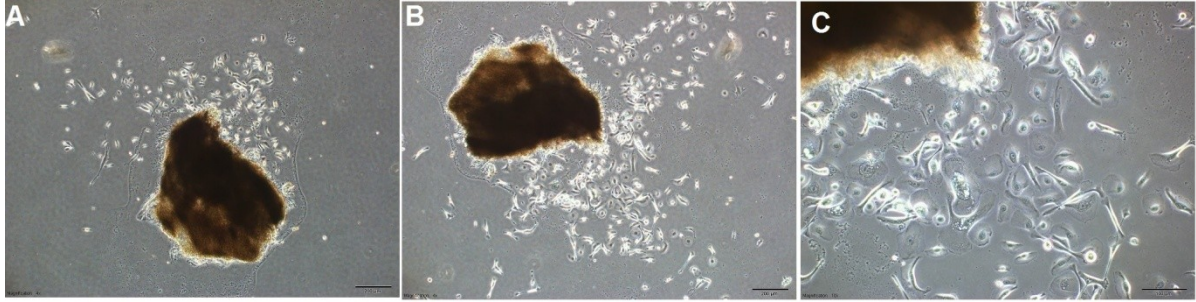
### **6.2. Kolesteatom Dokusunun Cerrahi Yolla Elde Edilmesi**

Kulak burun boğaz kliniğinde kolesteatomalı kronik otit media nedeniyle opere edilen 4 hastadan çalışmamıza dahil olmayı kabul eden hastaların cerrahileri sırasında steril tekniklerle eksize edilen kolesteatoma dokuları kontaminasyon ve bakteri sayısının azaltılması amacıyla serum fizyolojik ile yıkandı. Ardından 50 U/mL penisillin, and 50 mg/mL streptomisin içeren HBSS (Hanks'Balanced Salt Solution) solüsyonuna aktarılarak Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezine ulaştırıldı.

### **6.3. Keratinosit İzolasyon, Kültür ve Karakterizasyon Çalışmaları**

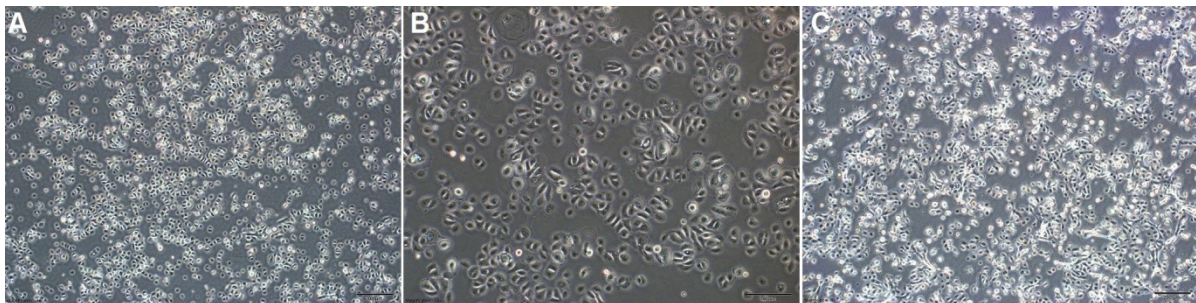
Kolesteatom örneklerinden keratinosit izolasyonu için dokular homojenizator (Medimachine, Becton Dickinson) ile küçük parçalara ayrılmış ve elde edilen küçük doku

parçaları petri kabına ekilerek explant kültür işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2). Ekilen hücrelerin %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C' lik ortamda Keratinocyte-SFM (Keratinosit serum free medyum) ile kültürü yapılmıştır. Sayıları artan hücreler aynı medium içerisinde 25 cm<sup>2</sup>lik kültür kaplarına aktarılmıştır (Şekil 3). Her 3 günde bir hücrelerin besi yeri değiştirilerek hücreler kültür kabının yüzeyine %70 oranında yayılınca pasajlama yapılarak. 3. pasajın sonunda elde edilen hücrelerin karakterizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 2:** Kolesteatom dokusundan elde edilen küçük doku parçaları petri kabına ekilerek gerçekleştirilen explant kültür işleminin zıt-faz mikroskopik görüntüleri. **A-** Pasaj 0 (P0) 17.gün , **B-** P0 21. gün , **C-** P0 21. gün (Ölçüm çubukları, **A-B:** 200 µm , **C:** 100 µm).

Keratinositlerin morfolojik olarak kübik yada yuvarlak formda olduğu ve kültürün ilk pasajlarında koloni oluşturarak çoğalmaya eğilimli oldukları gözlemlenmiştir. Kültürün ilerleyen günlerinde çoğalma kapasitelerinin arttıkları gözlemlenerek pasaj zamanlarının kültür kabının %90 nın kaplamasıyla ortalama 7-8 gün olduğu belirlenmiştir.

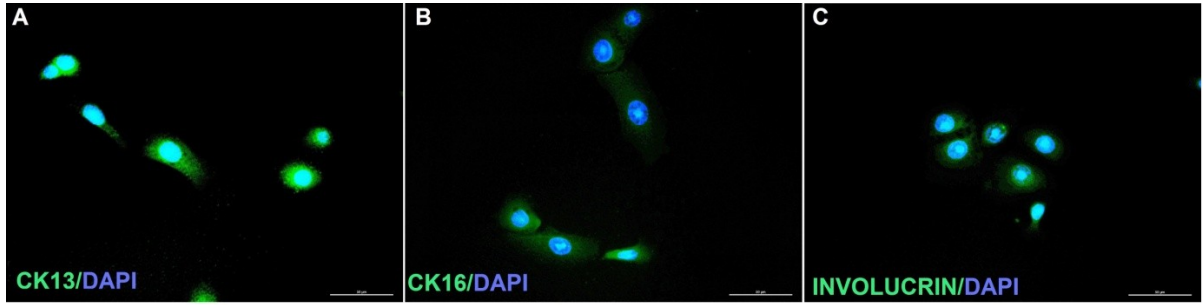


**Şekil 3.**Kolesteatom dokusundan elde edilen keratinositlerin kültürdeki zıt-faz mikroskopik görünüşleri (**A,B,C**).(A: Pasaj 2 (P2) 8.gün; B: P2 8. gün; C: P5 2.gün).(Ölçüm çubukları: **A-C:**200 µm ve **B:**100 µm)

Keratinositlerin immunositokimyasal yöntemlerle karakterizasyon çalışmaları, P3'de poli-L-lizin kaplı 8 kuyucuklu hücre kültür odacıklarına (Culture-Chamber-slide-8 well (24/pk)) ekilmiş 12x10<sup>3</sup> hücre/kuyucuk ile gerçekleştirilmiştir. Tutunmanın sağlanması için bir gece inkübasyonun ardından İF (immunofloresan) teknikler kullanılarak, belirlenmiş olan antikor paneli çalışılmıştır.CK13, CK16 ve İnvolukrin belirteçleri yönünden pozitif



oldukları floresan mikroskopta incelenerek gösterilmiştir (Şekil 4).

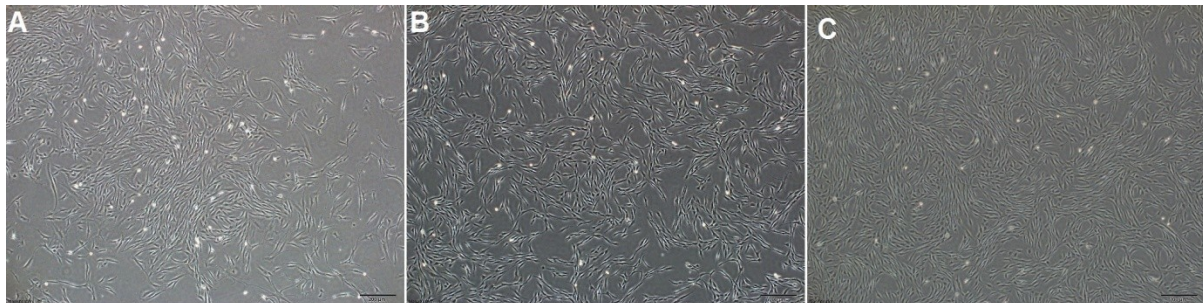


**Şekil 4:** Kolesteatom dokusundan elde edilen keratinositlerin karakterizasyonu için belirlenen belirteçlerin immunofloresan işaretleme ile analizi: **A-** CK13 (yeşil), **B-** CK16 (yeşil), **C-**INVOLUCRIN (yeşil). Çekirdekler DAPI (mavi) ile işaretlendi (Ölçüm çubukları, 50 µm).

#### 6.4. Fibroblast İzolasyonu ve Kültürü

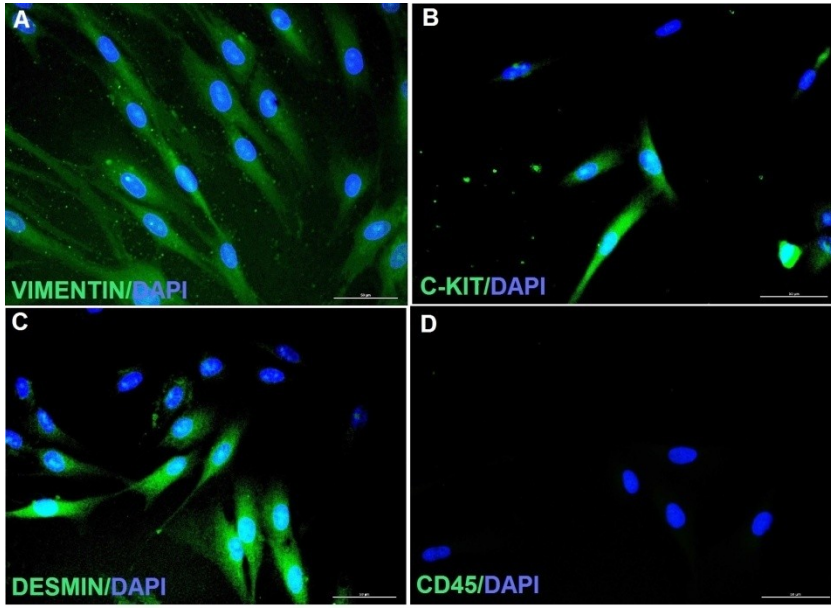
Elde edilen kolesteatom örneklerinden fibroblast izolasyonu için dokular 1 mm<sup>3</sup> lük küçük parçalara ayrılarak ve 4 mg/ml dispaz ve 3 mg/ml kollajenaz hazırlanmıştır. 45 dakika 37°C lik inkübasyon sonrasında hücreler PBS ile yıkanarak sayılmış ve DMEM, %10 FBS, 50 U/mL penisillin, and 50 mg/mL streptomisin eklentilerini içeren besi yerinde kültür kaplarına ekilmiştir. Ekilen hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C' lik ortamda inkübe edilmiştir (Şekil 5). Her 3 günde bir hücrelerin besi yeri değiştirilerek ve hücreler konfluent oluşturunca pasajlama yapılmıştır. 3. pasajın sonunda elde edilen hücrelerin karakterizasyon çalışmasına başlanmıştır.

İzole edilen fibroblastların, kültürün 13. gününde mezenkimal kök hücre (MKH) davranışlarından biri olan koloni oluşturmayı gerçekleştirdikleri gözlemlendi (Şekil 5A). İlerleyen pasajlarda ise giderek uzun ve ince bir şekil alarak, normal fibroblast görünümünü kazandıkları gösterildi (Şekil 5B-5C).



**Şekil 5.** Kolesteatom dokusundan elde edilen fibroblastların kültürdeki zıt-faz mikroskopik görünüşleri (**A,B,C**). (**A:** Pasaj 0 (P0) 13.gün; **B:** P2 4. gün; **C:** P3 4.gün).(Ölçüm çubukları: **A-B-C:**200 µm

Fibroblastların immunositokimyasal yöntemlerle karakterizasyon çalışmaları, P3'de poli-L-lizin kaplı 8 kuyucuklu hücre kültür odacıklarına (Culture-Chamber-slide-8 well (24/pk)) ekilmiş  $12 \times 10^3$  hücre/kuyucuk ile gerçekleştirilmiştir. Tutunmanın sağlanması için bir gece inkübasyonun ardından İF (immunofloresan) teknikler kullanılarak, belirlenmiş olan antikor paneli çalışılmıştır. VIMENTIN, DESMIN, C-KIT belirteçleri yönünden pozitif, CD45 yönünden ise negatif oldukları flouresan mikroskopta incelenerek gösterilmiştir (Şekil 6).



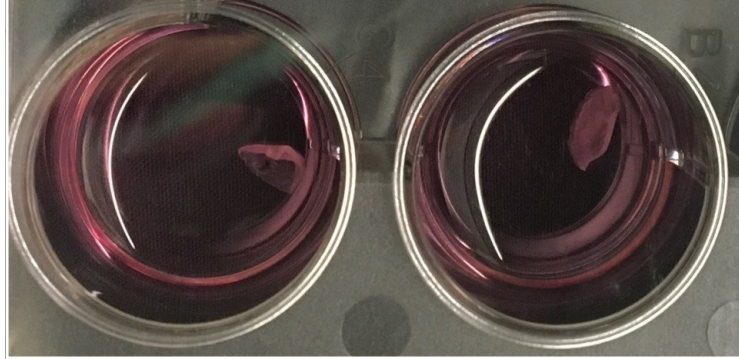
**Şekil 6.** Kolesteatom dokusundan elde edilen fibroblastların karakterizasyonu için belirlenen belirteçlerin immunofloresan işaretleme ile analizi: **A-** VIMENTIN (yeşil), **B-** C-KIT (yeşil), **C-** DESMIN, **D:** CD45 (yeşil). Çekirdekler DAPI (mavi) ile işaretlendi (Ölçüm çubukları, 50 µm).

### 6.5. Hücrelerin Tabaka Halinde Elde Edilmesi

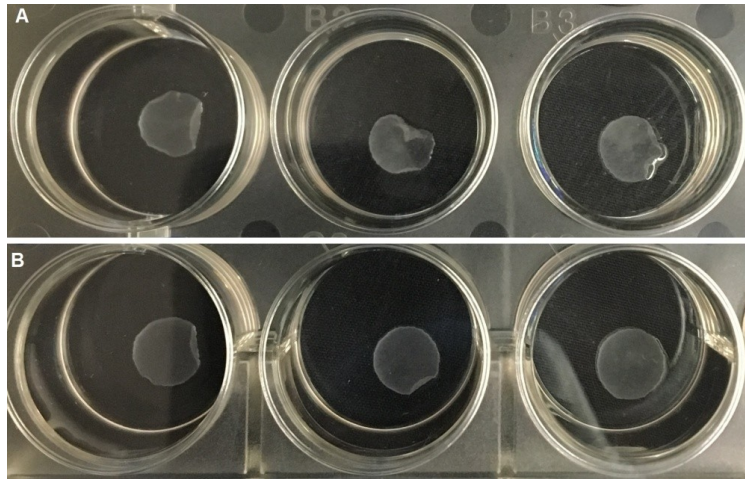
Kültür kaplarında çoğaltılan keratinosit ve fibroblast hücreleri belirli sayıya ulaştıklarında sıcaklık duyarlı kültür kaplarına ekilmiştir. Kolesteatom doku modelinin oluşturulması için 12 kuyucuklu kültür kabının bir kuyusuna  $1 \times 10^6$  fibroblast ve diğer bir kuyusuna kabına  $1 \times 10^6$  keratinosit ekilmiş ve 48 saat kültür sürecinden sonra  $37^\circ\text{C}$  lik inkübatörden alınıp  $20^\circ\text{C}$  de 30 dk. inkübasyondan sonra tabaka halinde hücreler kaldırılmıştır (Şekil 7). Elde edilen fibroblast tabakalarının kültür kabının yüzeyine tekrar tutunması için 1 saat  $37^\circ\text{C}$  lik inkübatörde bekletilmiş (Şekil 8), süre bitiminde tabaka halinde elde edilmiş keratinositler fibroblastların üzerine konarak 3 boyutlu kolesteatom modeli oluşturulmuştur (Şekil 9). Sonrasında ilaçların belirlenen dozları olan %1 diklofenak sodyum ve %1 5-Florourasil içeren besiyerleri elde edilen in vitro 3 boyutlu



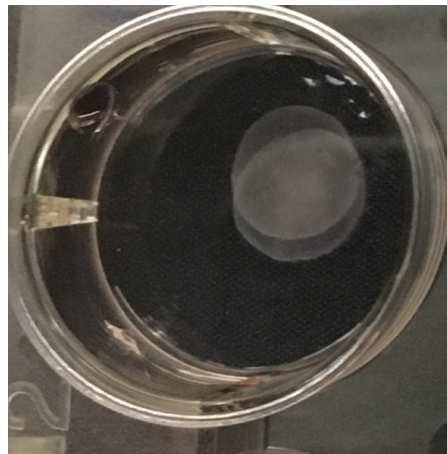
kolesteatom dokusu gruplarına ayrı ayrı eklenerek, 24 saat süre sonrasında ilaç etkisine bakılmak amacıyla annexin V ve WST-1 deneylerine geçilmiştir.



Şekil Figure 7. Fibroblast ve keratinositlerin tabaka halinde elde edildiği görülmektedir.



Şekil 8. Elde edilen fibroblast tabakalarının kültür kabının yüzeyine tekrar tutunması için 1 saat 37°C lik inkübatörde bekletildikten sonraki görüntüleri.



**Şekil 9.** Elde edilmiş keratinosit tabakası fibroblast tabakasının üzerine konularak 3 boyutlu kolesteatom modeli oluşturulmuştur.

Karakterizasyonları tamamlanan fibroblast ve keratinositler sıcaklık duyarlı kaplar kullanılarak kolesteatom doku modeli oluşturulduktan sonra diklofenak sodyumun sitotoksik etkisinin gösterilmesi ve gruplardaki hücre proliferasyonu, hücre canlılığı ve hücre morfolojisi üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla aşağıdaki deneyler yapıldı.

### **6.6.1. WST-1 Testi**

Sıcaklık duyarlı kültür kaplarında enzimsiz kültür sonrası oluşturulan kolesteatom dokusundaki hücrelerin optimize edilmiş olan %1 lik diklofenak sodyum deney grubunun canlılığı ve proliferasyonlarını tespit etmek için bu test uygulanmıştır. Bu grupta 24 saatlik süre sonunda etkin dozu bulunan diklofenak sodyumun 1., 3., 6. ve 12. saatlerdeki etkinlikleri değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirme negatif kontrol grubu ve 5 FU deney grubu ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Canlı ve apoptozisin erken evresindeki hücrelerin mitokondriyonları aracılığıyla WST-1 solüsyonuyla oluşturduğu reaksiyonda WST-1'in tetrazolium halkası, hücrelerin mitokondriyonlarında bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak turuncu renkli formazan kristalleri oluşturmakta iken, ölü hücreler formazan kristalleri oluşturmamaktadır. Kültür kabı içerisinde bulunan kolesteatom dokusuna %10 WST-1 eklenerek 2 saat inkübe edilmiştir (%5 CO<sub>2</sub>, 37°C de). İnkübasyon sonrası medyum içerikleri toplanarak absorbans değerleri 480 nm'de monokromatör sistemli mikropilaka okuyucuda tespit edilmiştir. Tüm testler üç kez tekrarlanmıştır. Okuma sonrası elde edilen veriler student't testi ile analiz edilmiştir.

### **6.6.2. Hücrelerinin Apoptoz Deneyi**

Sıcaklık duyarlı kültür kaplarında enzimsiz kültür sonrası oluşturulan kolesteatom dokusundaki tabakaların besiyerinden 500 µl toplanarak Annexin V human ELISA kiti kullanılarak ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu grupta 24 saatlik süre sonunda etkin dozu bulunan diklofenak sodyumun 1., 3., 6. ve 12. saatlerdeki etkinlikleri değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirme negatif kontrol grubu ve 5 FU deney grubu ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir Apoptoz düzeyleri monokromatör sistemli mikropilaka okuyucuda tespit edilmiştir. Tüm testler üç kez tekrarlanmıştır.

### **6.6.3. İn-Vitroda Elde Edilen Kolestatom Dokusunun İmmünoflorasan İncelemesi**

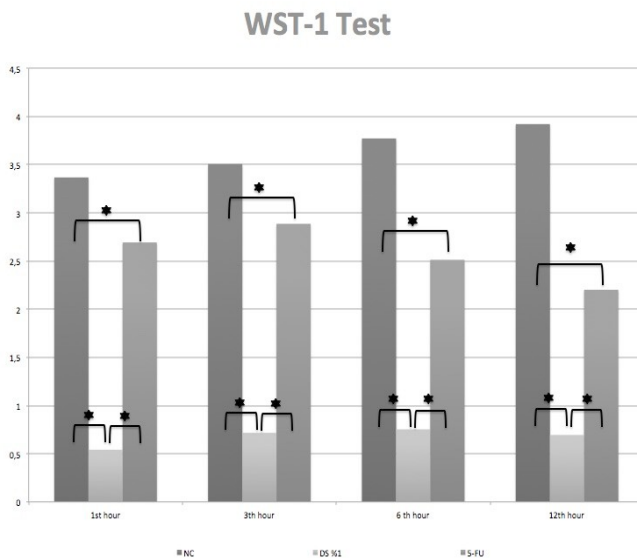
Fibroblast ve keratinosit hücrelerinden elde edilen in-vitro kolesteatom dokusu uygun

doz belirleme çalışması yapıldıktan sonra bu 3 boyutlu dokunun bütünlüğünü floresan boya ile görebilmek için dokular %4 lük paraformaldehit ile fikse edildikten sonra immunfloresan boyama işlemine geçilmiştir. Non-spesifik serum blokajından sonra dokular 1 gece boyunca +4° C'de optimal dilüsyondaki **CK13, İNVOLUCRİN, VİMENTİN, DESMİN** primer antikorları ile nemli ortamda inkübe edilmiştir. Bundan sonra dokular 0.01 M PBS ile yıkandıktan sonra uygun bir sekonder antikor ile 60 dakika ışıktan korunarak inkübe edilmiştir. Çekirdek zemin boyaması için DAPI eklenmiş kapatma medyumu ile kapatılmıştır. Spesifik immün işaretlenmenin varlığı konfokal mikroskop altında incelenmiştir. Dokularda apoptoz düzeyini görebilmek ve sonucu ELISA apoptoz deneyinin sonucu ile desteklemek için **anti-capase 3** ile işaretlenerek ve DAPI ile kapatılmıştır ve örnekler konfokal mikroskobunda incelenmiştir.

## 7. BULGULAR

### 7.1. WST-1 Testi

Analiz sonuçlarına göre 3 Boyutlu kolesteatom dokusunun 1, 3, 6, ve 12 saatlik %1 diklofenak sodyum (DS) ve 5- fluourosil (5-FU) ile kültür sürecinde canlılık ve proliferasyon düzeyini belirlemek için uygulanan WST-1 deneyi sonrasında her saat grubu kendi içinde kontrol grubu ve %1 DS student't testi ile karşılaştırıldığında sonuç  $P < 0.001$  olduğundan 3 boyutlu dokudaki hücrelerin canlılığının %1 DS li kültür kabında anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. Kontrol grubu (standart besiyeri ile kültüre edilen) ve 5-FU grubu karşılaştırıldığında ise  $P < 0.001$  olduğundan anlamlı bir canlılık kaybı olduğu fakat %1 DS ye göre canlılık kapasitesinin daha fazla olduğu belirlenmiştir (şekil 10). Bu sonuca göre %1 DS nin hücrelerin canlılık ve proliferasyonu üzerine olan olumsuz etkisinin 5 FU ya kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür.

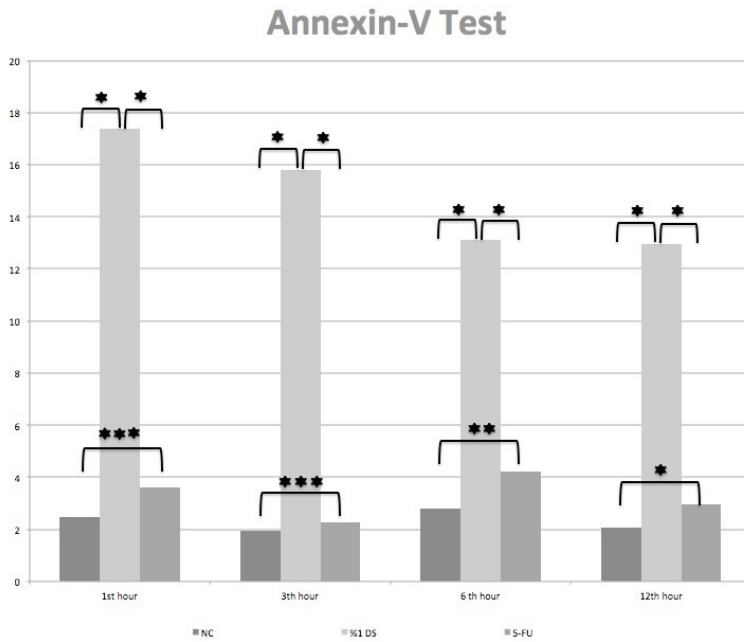


**Şekil 10:** Kontrol grubu, %1 lik Diklofenak Na ve %1 lik 5-FU gruplarının 1, 3, 6 ve 12 .saat çoğalma ve canlılık kapasitesinin WST-1 analizi ile karşılaştırılması. Grupların karşılaştırılması sonucu %1 lik DS grubunun diğer hücre gruplarına göre çoğalma ve canlılık kapasitesinin en az olduğu görülmüştür. ( $n=3$ , ortalama $\pm$ SS,  $*P < 0.001$ ).

## 7.2. Hücrelerinin Apoptoz Deneyi

Analiz sonuçlarına göre 3 Boyutlu kolesteatom dokusunun 1, 3, 6,ve 12 saatlik %1 diklofenak sodyum ve 5- fluourosil ile kültür sürecinde apoptoz düzeyini belirlemek için uygulanan Annexin V deneyi sonrasında her saat grubu kendi içinde %1 DS, %1 5-FU ve negatif kontrol grupları arasında student't testi ile karşılaştırıldığında sonuç  $*P<0.001$  olduğundan 3 boyutlu dokudaki hücrelerin apoptoz düzeyinin %1 DS li kültür kabında anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Kontrol grubu ve 5-FU grubu karşılaştırıldığında ise ilerleyen saatlerde apoptoz düzeyinde anlamlı değişikliklerin oluşturğu görüldü. Bu sonuçlara göre %1 DS nin hücrelerin apoptozu üzerine olan etkisinin 5 FU ya kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür.

**Şekil 11:** Kontrol grubu, %1 lik Diklofenak Na ve %1 lik 5-FU gruplarının 1, 3, 6 ve 12 .saat Apoptoz düzeylerinin karşılaştırılması Annexin V analizi ile karşılaştırılması. Grupların karşılaştırılması sonucu %1 lik Diklofenak Na grubunun diğer deney gruplarına göre apoptoz aktivitesinin daha fazla olduğu görülmüştür. (n=3, ortalama±SS, \*P <0.001, \*\* P <0.05, \*\*\* P >0.05).



WST Analizi ve Annexin V testleri % 2 lik diklofenak sodiyum düzeylerinde tekrarlandığında pozitif ve negative kontrol gruplarına göre anlamlı farklılıklar devam etse de

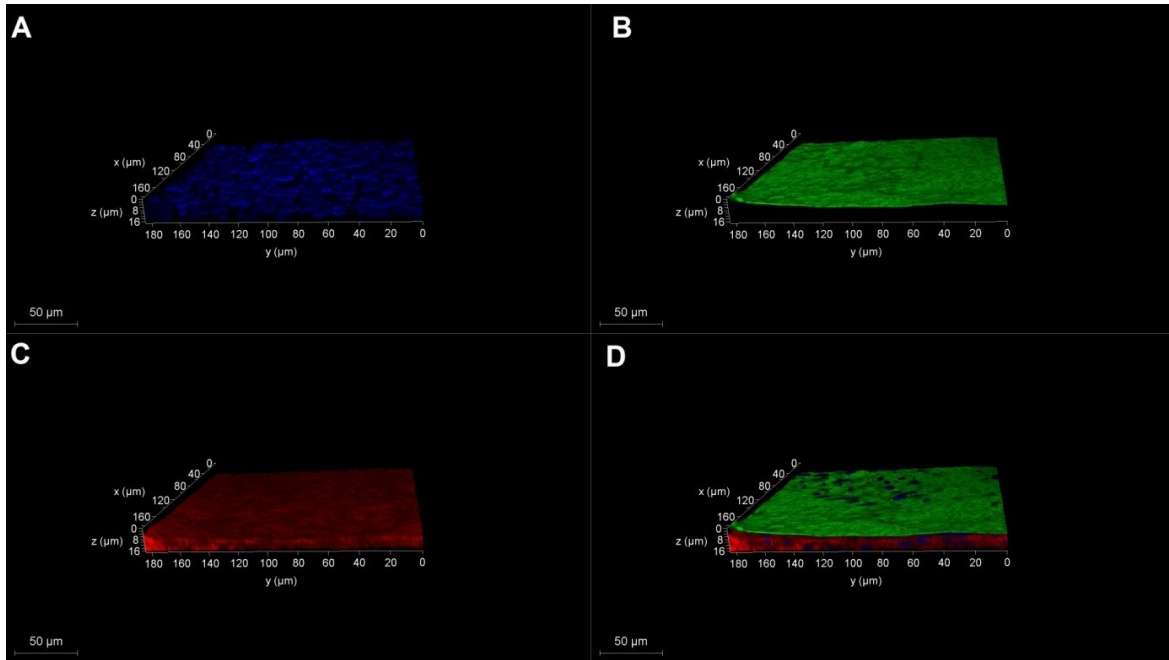
%1 lik ve % 2 lik Diklofenak sodyum uygulamaları arasında fark olmadığı için daha yüksek ilaç oranları ile çalışılmamıştır (Tablo 1).

	%1 DS	%2 DS	p
WST-1	0,181-0,009	0,180-0,008	>0.05
Annexin-V	9,54-1,13	9,48-0,89	>0.05

**Tablo 1.** %1 ve %2 lik DS uygulamaların canlılık ve apoptoz üzerine etkilerinin karşılaştırılması

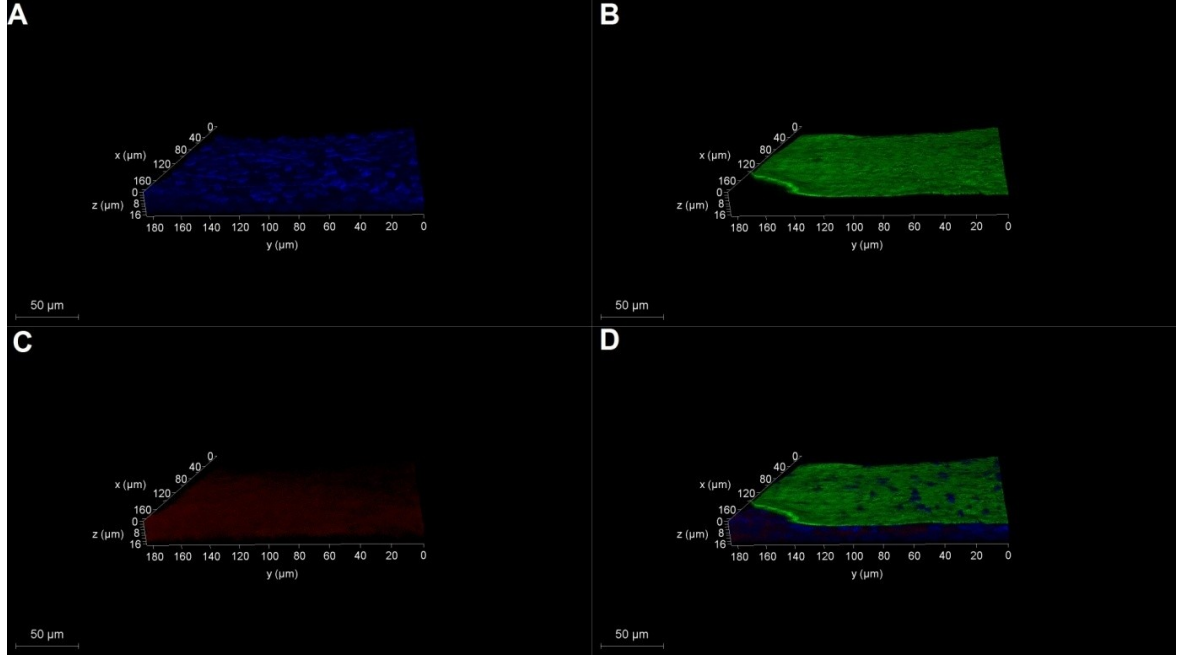
### 7.3. İn-Vitroda Elde Edilen Kolesteatom Dokusunun İmmünoflorasan İncelemesi

Yapılan 3 boyutlu konfokal mikroskop görüntüleme sonucunda vimentin ve involucrin belirteçlerinin aynı 3 Boyutlu dokuda birlikte boyanması sonrasında pozitif olduğu gösterilmiştir. Elde edilen 3 Boyutlu dokunun bütünlüğü bu görüntüleme ile tespit edilmiştir. Bir diğer belirteç grubu olan desmin ve CK 16 dokularda yine pozitif boyanarak dokunun 3 boyutlu yapısının bütünlüğünü koruduğu gözlenmiştir. %1 DS, 5-FU ve kontrol gruplarına yapılan anti-caspase 3 işaretleme sonucu deney gruplarına göre farklı yoğunlukta pozitif ışımalar elde edilmiştir. %1 DS grubunda floresan ışımaların daha fazla olduğu yapılan analizlerde görülmektedir. Bu sonucun annexin V ELISA verileri ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

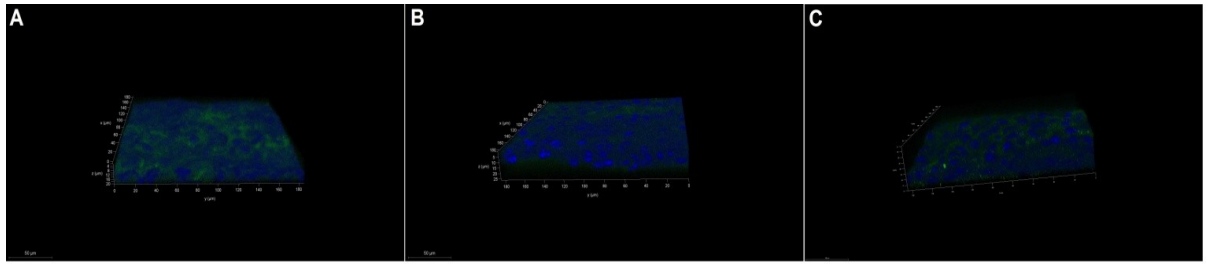


**Şekil 12:** Fibroblast ve keratinosit hücre tabakalarının üst üste getirilmesiyle elde edilen 3 boyutlu kolesteatom dokusunun Vimentin ve İnvoclerin ile immünofloresan boyama görüntüleri. Şekilde üste fibroblast altta keratinosit

tabakası bulunmakta.Tabakanın x, y ve z eksenlerinden kalınlık ölçüleri şekilde görülmekte.**A:** Hücrelerin çekirdeği DAPI(mavi), **B:** Fibroblast tabakası Vimentin (Yeşil), **C:** Keratinosit tabakası İnvolutrin (Kırmızı), **D:** Her bir görüntünün birleştirilmiş hali (merged). Ölçüm çubukları: 50µm

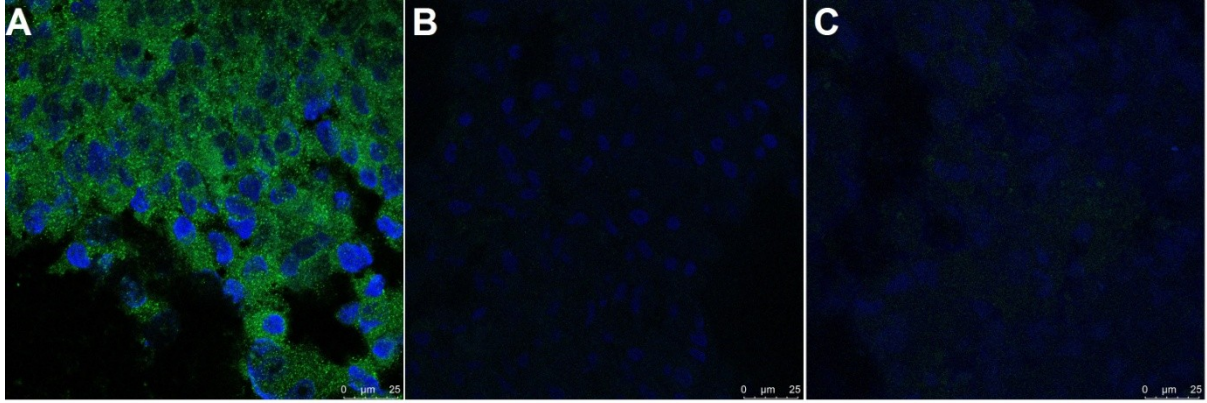


**Şekil 13:** Fibroblast ve keratinosit hücre tabakalarının üst üste getirilmesiyle elde edilen 3 boyutlu kolesteatom dokusunun Desmin ve CK16 ile immunfloresan boyama görüntüleri. Şekilde üstte fibroblast altta keratinosit tabakası bulunmakta.Tabakanın x, y ve z eksenlerinden kalınlık ölçüleri şekilde görülmekte.**A:** Hücrelerin çekirdeği DAPI(mavi), **B:** Fibroblast tabakası Desmin (Yeşil), **C:** Keratinosit tabakası CK16 (Kırmızı), **D:** Her bir görüntünün birleştirilmiş hali (merged). Ölçüm çubukları: 50µ



**Şekil 14:** 3 boyutlu kolesteatom dokusunun anti caspase 3 ile immunfloresan boyama görüntüleri.Tabakanın x, y ve z eksenlerinden kalınlık ölçüleri şekilde görülmekte.**A:** %1 DS grubu anti caspase 3 (yeşil), DAPI(mavi), **B:** Kontrol grubu anti caspase 3 (yeşil), DAPI(mavi), **C:** 5-FU grubu anti caspase 3 (yeşil), DAPI(mavi). Ölçüm çubukları: 50µ. %1 DS grubunda diğer gruplara kıyasla daha fazla yeşil ışımaya görülmekte.Buda apoptozun daha fazla olduğunu göstermektedir.





**Şekil 15:** 3 boyutlu kolesteatom dokusunun anti caspase 3 ile immunfloresan boyama görüntüleri.Konfokal mikroskobunda taranan 2 boyutlu kesitlerden alınmış görüntüler.**A:** %1 DS grubu anti caspase 3 (yeşil), DAPI(mavi), **B:** Kontrol grubu anti caspase 3 (yeşil), DAPI(mavi), **C:** 5-FU grubu anti caspase 3 (yeşil), DAPI(mavi). Ölçüm çubukları: 50µ. %1 DS grubunda diğer gruplara kıyasla daha fazla yeşil ışımaya görülmekte.Buda apoptozun daha fazla olduğunu göstermektedir.

## 8. TARTIŞMA/SONUÇ

Kolesteatomun histopatolojik yapısı temel olarak; matriks, perimatriks ve keratin debris olmak üzere 3 tabakadan oluşmaktadır. Matriks tabakası keratinize yassı epitel hücrelerinden meydana gelir ki bu tabaka germinatif tabaka olarak da bilinir. Matrix tabakasının mitotik aktivitesi yüksek olup hızlı mitoz nedeniyle dökülen hücreler ve keratin dokusu, merkezde bulunan keratin debrisini oluşturmaktadır. Matriks bazal membran aracılığı ile ince retiküler ve elastik liflerden oluşan perimatriks tabakası ile,perimatriks ise temporal kemik dokusu ile temas halindedir. Kolesteatomun patolojik tanısı için matriks, perimatriks ve keratin debrisin birlikte görülmesi gereklidir (35).

Kolesteatom cerrahisi hastalığın şiddeti, tutulum yeri ve yaygınlığına bağlı olarak; transtimpanik yaklaşımlar, intakt kanal timpanomastoidektomiler, açık kavite timpanomastoidektomiler, total veya subtotal petrozektomi teknikleri gibi sınırlı yaklaşımlardan geniş cerrahi tekniklere kadar pekçok farklı yaklaşım ile opere edilebilir (36). Tüm yöntemlerde geçerli olan temel cerrahi prensip, matriks dokusunun tümüyle eksize edilmesidir. Ancak ne yazık ki; her olguda bu dokunun tümüyle eksizyonu önemli yapılarla olan ilişkileri veya cerrahi görüş kısıtlılıkları nedeniyle mümkün olamayabilmektedir. Kolesteatom dokusunun tümüyle temizlenememesi durumunda ise hastalık nüks etmekte ve bu nedenle revizyon cerrahi gereksinimleri olabilmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalarda cerrahi tekniklere göre değişmekle birlikte nüks kolesteatom oranlarının % 5 ile % 70 arasında değiştiği bildirilmiştir (6,7)



Hali hazırda orta kulak kolesteatomun primer tedavisi için veya cerrahiye ek olarak kullanılabilecek klinik kullanıma girebilmiş herhangi bir medikal tedavi bulunmamaktadır. Ancak bu konuda etkinliği ispat edilen moleküllerin özellikle otolojik cerrahinin gizli noktaları olan sinüs timpani, posterior sinüs ve supratubal reses gibi alanlarda veya cerrahi müdahalenin riskli olabildiği, oval pencere, yuvarlak pencere ve dehissan juguler bulbus gibi yapıların üzerindeki matriks dokusunun eradikasyonu için etkili olacağı da aşikardır.

Bu konuda çalışılan bir molekül olan 5-Fluourasil çeşitli hayvan çalışmalarında kullanılarak kolesteatom üzerine olan etkisi kanıtlanmıştır (15, 16). 5-Fluourasil, timidilat sentazı hedef alan bir pirimidin analogu olup, özellikle mitotik aktivitesi yüksek hücrelerde DNA sentezini inhibe ederek etki göstermektedir. Topikal formu in situ bazal hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom, keratoakantom ve aktinik keratoz gibi cilt lezyonlarında kullanılmaktadır (17). Ayrıca timpanik membranın sağlam olduğu retraksiyon ceblerinde kolesteatoma karşı etkili olduğu da bir klinik çalışmada gösterilmiştir (15). Ancak ne yazık ki ototoksik ve nörotoksik etkisi olan bu molekülün kullanımı kısıtlı olmaktadır (37, 38). Bu etkileri nedeniyle 5-Fluourasil çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Diklofenak sodyum, non-steroid anti-inflamatuar bir ilaç olup, siklooksijenaz inhibisyonu ile anjiogenez ve hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Bunun dışında apoptozisin mitokondrial yolunu aktive ederek de hücre ölümüne neden olduğu çeşitli çalışmalarla ispatlanmıştır (22). Skuamöz hücreli karsinom için prekanseröz bir lezyon olup keratinositlerin intraepitelyal proliferasyonu olan aktinik keratozda ve bazal hücreli cilt karsinomunda günümüzde kullanım alanı bulan bu ilacın, yassı epitel hücrelerinin anormal proliferasyonu olan kolesteatom dokusunda da etkili olabileceği düşünülmüştür (20,21).

Çalışmamız sonuçları incelendiğinde diklofenak sodyum grubunda negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre canlılık ve proliferasyon oranlarının daha düşük, apoptoz oranlarının ise daha yüksek bulunması diklofenak sodyumun kolesteatom üzerine sitotoksik etkisini ispatlamaktadır. Sonuçların pozitif kontrol grubundan da istatistiksel anlamlı olarak daha etkili bulunması ise günümüzde özellikle dış kulak yolu ve timpanik membran perforasyonun görülmediği attik bölge kolesteatomlarında klinik kullanımda olan 5-FU yerine diklofenak sodyumun yakın gelecekte kullanıma girebileceği şeklinde yorumlanabilir.

Kolesteatom dokusu ile ilgili çalışmalarda kullanılabilecek deneysel modeller arasında in-vivo deney hayvan modelleri ve in-vitro hücre temelli modeller bulunmaktadır(9-12,39). In-vivo yöntemler günümüzde halen kullanılmakla birlikte bu tür tekniklerle yapılan çalışmalarda; deneklerin anatomik, hormonal ve immun özellikleri gibi deneklere bağlı

faktörler veya deney aşamalarındaki hem modelleme hem de histolojik doku eldesinde çalışan araştırmacılara ait faktörler gibi objektifliği etkileyebilen nedenler çalışma sonuçlarını olumsuz etkileyebilmektedir. Yine in vivo çalışmalardaki etkin doz çalışmaları in-vitro çalışmalara kıyasla daha güç olabilmektedir ve gereksiz denek kayıplarına neden olabilmektedir. Bu sebeple çalışmamızda in-vitro deney modeli oluşturularak bu etkilerin minimize edilmesine çalışılmıştır.

Kolesteatomun medikal tedavisi konusunda hücre kültürü ile yapılmış çalışma oldukça kısıtlıdır. In-vitro kolesteatom hücre kültürleri temel olarak kolesteatom dokusunun iki hücresi olan fibroblast ve keratinosit üzerine odaklanmıştır. Bu konuda keratinosit hücre kültürlerinin kullanıldığı çalışmalar yanında keratinosit ve fibroblastların kokültürü ile üretilmiş modellerde yapılan çalışmalar da bulunmaktadır (13,14). Çalışmalarda bu iki hücre grubu arasındaki parakrin etkileşimlerin kolesteatom patofizyolojisindeki önemini vurgulamaktadır. (2,24-27) Laeeq arkadaşlarının fibroblast ve keratinositleri ayrı ayrı ürettikten sonra kokültere ettikleri bir çalışmada oluşturulan kolesteatom modelinde, matrix metalloproteaz sekresyon hızı ve aktivitelerinin, hücre migrasyon ve invazyon kapasitelerinin, tip 4 kollajeni proteoliz etme özelliklerinin tek başına üretilen fibroblast veya keratinosit hücre gruplarına göre anlamlı olarak daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple çalışmamızda da keratinosit hücrelerini tek başına üretmek yerine kolesteatom modeline uygun olarak birbirleri ile hücre hücre teması sağlanmış hücre grupları oluşturulduktan sonra bu tabakaların üst üste yerleştirilmesi sonucu gerçek bir kolesteatom dokusuna yakın bir model oluşturulmuştur.

İn vitro doku oluşturmada en son yaklaşım, hücreleri tek tek kullanmak yerine, in vivo ortamdakini taklit etmek amacıyla "hücre tabakalarını" kullanarak doku oluşturmaktır. Hücre tabakalarına üç boyut kazandırılması işlemi farklı hücre tabakalarının sıcaklık duyarlı kültür kaplarında üretilmeleri ve ardından başka bir sıcaklık duyarlı kültür kabında bu tabakaların üst üste kokültüre edilmeleri yoluyla gerçekleşmektedir. Bu sayede ekstraselüler matriks ve hücre hücre bağlantıları korunarak in-vivo duruma daha yakın bir hücre grubu elde edilebilmektedir. Literatür incelendiğinde şu ana kadar hücre tabakalarının sadece tedavi amaçlı doku oluşturmak amacıyla kullanılmış olduğu görülebilir. Çalışmamızda ise gerçeğine yakın bir hastalık modelinin 3 boyutlu olarak oluşturulması amacıyla hücre tabakaları ilk kez kullanılmıştır. İmmunoflorasan boyama yöntemleri kullanılarak 3 boyutlu kolesteatom modelinin oluşturulduğu çalışmamızda gösterilmiştir.

Deney hayvanları kullanılarak gerçekleştirilen in vivo çalışmalarda daha çok kolesteatom oluşumunu engelleyen ilaçlar incelenmektedir. Hücre kültürü kullanılarak yapılan sınırlı sayıda çalışmalarda ise kolesteatom dokusu üzerine ilaçların etkisi

alışılabilmektedir.Minotti ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptığı bir çalışmada all trans retinoik asidin kolesteatom hucyelerinin migrasyonu üzerine etkisi araştırılmış ve bu molekülün migrasyonu geçici olarak önlediği gösterilmiştir (13). Yine 2000 yılında Kountakis ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada bir kalsiyum kanal blokeri olan verapamilin etkisi çalışılmış ve kolesteatom hucyelerinin migrasyonunu geri dönüşümsüz bir şekilde önlediği gösterilmiştir. (14). Çalışmamızda ise hem hücre canlılık ve proliferasyonanalizleri, hem de apoptoz düzeyleri değerlendirilerek diklofenak sodyumun kolesteatom üzerine düşük konsantrasyonlarda dahi sitotoksik etkili olabileceği gösterilmiştir. Diklofenak sodyumun kolesteatom üzerine olan etkisi literatürde ilk kez gösterilmiştir.

Sonuç olarak literatürde ilk kez hücre tabakaları kullanılarak oluşturulan 3 boyutlu kolesteatom deney modeli ile diklofenak sodyumun kolesteatom üzerine etkinliği gösterilmiştir. Çalışmamızda kullanılan düşük diklofenak sodyum dozları ile ototoksik ve nörotoksik etkilerin çalışılması sonrasında dış kulak yolu ve timpanik membran perforasyonun görülmediği attic bölge kolesteatomları dışında orta kulak kolesteatomlarında da kullanım alanı oluşabilir

## 9. KAYNAKLAR LSTESİ ve ATIFLAR

1. Vayısoğlu Y., Ünal M. 2006. 'Kolesteatom', KBB-Forum, 5(2), 97-112.
2. Raynov AM., Choung YH., Park HY., Choi SJ., Park K. 2008. 'Establishment and characterization of an in vitro model for cholesteatoma', Clin Exp Otorhinolaryngol, 1(2): 86-91.
3. Aquino JE., Cruz Filho NA., de Aquino JN. 2011. 'Epidemiology of middle ear and mastoidcholesteatomas: study of 1146 cases' Braz J Otorhinolaryngol, 77(3): 341-7.
4. Tos M. 1999. 'Incidence, etiology and pathogenesis of cholesteatoma in children', Ann Otol Rhinol Laryngol, 1 988;40:110-7.
5. Kemppainen HO., Puhakka HJ. Laippala PJ., Sipilä MM., Manninen MP., Karma PH. 1999. 'Epidemiology and aetiology of middle ear cholesteatoma' Acta Otolaryngol,119(5):568-72.
6. Roden D, Honrubia VF, Wiet R. 1996. Outcome of residual cholesteatoma and hearing in mastoid surgery. J Otolaryngol, 25:178–181.
7. Nyrop M, Bonding P. 1997. Extensive cholesteatoma: long-term results of three surgical techniques. J Laryngol Otol,111:521–526.
8. Cody DTR, McDonald TJ. 1984. Mastoidectomy for acquired cholesteatoma: follow-up to 20 years. Laryngoscope, 94:1027-30.
9. Vassalli L., Harris DM., Gradini R., Applebaum EL. 1988. 'Propylene glycolinducedcholesteatoma in chinchilla middle ears' Am J Otolaryngol,9(4): 180-8.
10. Schmidt SH, Hellström S. 1994. 'Experimental cholesteatoma in the rat', Acta Otolaryngol, 114(4): 430-4.
11. McGinn MD., Chole RA., Henry KR. 1982. 'Cholesteatoma. Experimental induction in the Mongolian Gerbil, Meriones Unguiculus', Acta Otolaryngol, 93(1-2): 61-7.
12. Park K., Chun YM., Kim SM., Lee DH. 2011. 'Experimental cholesteatoma by transplanting a free skin graft in the bulla of Mongolian gerbil', Journal of Biomedicine and Biotechnology, Article ID 394241, 11 pages
13. Minotti AM., Stiernberg CM., Cabral F. 1996. 'Inhibition of cholesteatomamigration in vitro with all-trans retinoic acid', Otolaryngol Head Neck Surg, 114:768-76.
14. Kountakis SE, Chang CY, Minotti AM, Cabral FR. 2000. 'Effect of verapamil oncholesteatoma migration in vitro' Otolaryngol Head Neck Surg, 122(1): 91-5.
15. Yamamoto-Fukuda T., Terakado M., Hishikawa Y., Koji T., Takahashi H. 2008. 'Topical application of 5-fluorouracil on attic cholesteatoma results in downregulation

- ofkeratinocyte growth factor and reduction of proliferative activity' Eur ArchOtorhinolaryngol, 265(10): 1173-8.
16. Takahashi H., Funabiki K., Hasebe S., Fukuda-Yamamoto T., Kaieda S., Iwanaga T., Kumagami H., Takasaki K. 2005. 'Clinical efficacy of 5-fluorouracil (5-FU) topical cream for treatment of cholesteatoma' Auris Nasus Larynx, 32(4): 353-7.
  17. Çalışkan E., Özmen İ., Açıkgöz G., Tunca M. 2014. 'Dermatolojide Kemoterapötik ve Biyolojik ilaçların İntralezyonel Kullanımları', Türk J Dermatol, 3, 154-60.
  18. Nelson CG. 2011. 'Diclofenac gel in the treatment of actinic keratoses', Ther Clin Risk Manag, 7:207-11.
  19. Stockfleth E., Ferrandiz C., Grob JJ, et al. 2008. 'Development of a treatment algorithm for actinic keratoses: A European consensus' Eur J Dermatol, 18(6): 651-659.
  20. Newman MD, Weinberg JM. 2007. Topical therapy in the treatment of actinic keratosis and basal cell carcinoma. Cutis, 79:18-28.
  21. Brinkhuizen T, Frencken KJ, Nelemans PJ, et al. 2016. The effect of topical diclofenac 3% and calcitriol 3 µg/g on superficial basal cell carcinoma (sBCC) and nodular basal cell carcinoma (nBCC): A phase II, randomized controlled trial. J Am Acad Dermatol, 75:126-34.
  22. Gómez -Lechón MJ., Ponsoda X., O'Connor E., Donato T., Castell JV., Jover R. 2003. 'Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS' Biochem Pharmacol, 1;66 (11): 2155-67.
  23. Rodust PM., Fecker LF., Stockfleth E., Eberle J. 2012. 'Activation of mitochondrial apoptosis pathways in cutaneous squamous cell carcinoma cells by diclofenac/hyaluronic acid is related to upregulation of Bad as well as downregulation of Mcl-1 and Bcl-w', Exp Dermatol, 21(7): 520-5.
  24. Yoshikawa M., Kojima H., Yaguchi Y., Okada N., Saito H., Moriyama H. 2013. 'Cholesteatoma fibroblasts promote epithelial cell proliferation through overexpression of epiregulin' PLoS On, 24;8(6):e66725.
  25. Raffa S., Leone L., Scrofani C., Monini S., Torrisi MR., Barbara M. 2012. 'Cholesteatoma-associated fibroblasts modulate epithelial growth and differentiation through KGF/FGF7 secretion', Histochem Cell Biol, 138(2): 251-69.
  26. Huang T., Yan SD., Huang CC. 1989. 'Colony-stimulating factor in middle ear cholesteatoma' Am J Otolaryngol, 10(6): 393-8.

27. Cheshire IM., Blight A., Ratcliffe WA., Proops DW., Heath DA. 1991. 'Production of parathyroid-hormone-related protein by cholesteatoma cells in culture', *Lancet*, 26; 338(8774): 1041-3.
28. Nakayama M., Okano T, Françoise M. 2010. 'Winnik. Poly (N-isopropylacrylamide)-based Smart Surfaces for Cell Sheet Tissue Engineering', *Material Matters*, 5.3, 56.
29. Ohki T., Yamato M., Murakami D., et al. 2006. 'Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model' *Gut*, 55: 1704.
30. Matsuda N., Shimizu T., Yamato M., Okano T. 2007. 'Tissue Engineering Based on Cell Sheet Technology', *Adv. Mater.*, 19, 3089–3099.
31. Nishida K, Yamato M, Okano T. et al. 2004. 'Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets Composed of Autologous Oral Mucosal Epithelium', *The New England Journal of Medicine*, 6; 351(12): 1187-96.
32. Elloumi-Hannachi I, Yamato M & Okano T. 2009. 'Cell sheet engineering: A unique nanotechnology for scaffold-free tissue reconstruction with clinical applications in regenerative medicine', *Blackwell Publishing Ltd Journal of Internal Medicine*, 267; 54–70.
33. Shiroyanagi Y., Yamato M., Yamazaki Y., Toma H., Okano T. 2004. 'Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps' *Bju International*, 1069-1075.
34. Haraguchi Y., Kikuchi A., Okano T. 2006. 'Electrical coupling of cardiomyocyte sheets occurs rapidly via functional gap junction formation', *Biomaterials*. 27(27): 4765-74.
35. Ferlito A., Devaney KO., Rinaldo A., Milroy CM., Wenig BM., Iurato S., McCabe BF. 1997. 'Clinicopathological consultation. Ear cholesteatoma versus cholesterol granuloma', *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 106(1): 79-85.
36. Tomlin J, Chang D, McCutcheon B, Harris J. 2013. Surgical technique and recurrence in cholesteatoma: a meta-analysis. *Audiol Neurootol*, 18(3):135-42.
37. Iwanaga T., Tanaka F., Tsukasaki N., Terakado M., Kaieda S., Takasaki K., Kumagami H., Takahashi H. 2006. 'Does topical application of 5-fluorouracil ointment influence inner ear function?', *Otolaryngol Head Neck Surg*, 134(6): 961-5.
38. Pirzada, N. A., Ali, I. I., & Dafer, R. M. 2000. Fluorouracil-induced neurotoxicity. *Annals of Pharmacotherapy*, 34(1), 35-38.
39. Ismi, O., Karabulut, Y. Y., Bal, K. K., Vayisoglu, Y., & Unal, M. 2017. Single dose intratympanic mesna application inhibits propylene glycol induced cholesteatoma formation. *The Journal of Laryngology & Otology*, 131(3), 215-220.



**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Dr. Öğr. Üyesi AHMET KARA
Proje No:	216S961
Proje Başlığı:	Kolesteatom Hücre Kültüründe Diklofenak Sodyum Ve 5-Fluourasil'In Etkisinin Değerlendirilmesi
Proje Türü:	3001 - Başlangıç AR-GE
Proje Süresi:	15
Araştırmacılar:	YUSUFHAN YAZIR, MAHMUT SİNAN YILMAZ, MEHMET GÜVEN
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	SAKARYA Ü. TIP F. CERRAHİ TIP BİLİMLERİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/09/2017 - 15/12/2018
Onaylanan Bütçe:	77130.0
Harcanan Bütçe:	54340.5
Öz:	<p>Giriş: İnvaziv ve destrüktif özellikleri olmasına rağmen benign bir hastalık olan kolesteatoma kronik otit mediaya bağlı komplikasyon oranlarının artışından ve yüksek rekürrens oranlarından sorumludur. Bilinen tek etkin tedavi yöntemi cerrahi eksizyon olan bu hastalıkta medikal tedavi alternatiflerinin tespiti, hastalığın tedavi algoritmasına yeni bakış açıları oluşturabilir.</p> <p>Yöntemler: Hücre kültürü için gerekli olan kolesteatom dokuları kliniğimizde opere edilen ve çalışma için doku vermeyi kabul eden dört farklı hastadan elde edildi. Ardından elde edilen keratinosit ve fibroblast hücreleri sıcaklık duyarlı kültür kaplarında üç boyutlu kolesteatom modelini oluşturmak için birlikte kültüre edildi ve bu model üzerinde %1 ve %2 lik diklofenak sodyum dozları canlılık ve hücre çoğalma oranları açılarından WST-1 ve annexin-V testleri ile incelendi.</p> <p>Bulgular: Çalışma sonuçlarında % 1 lik diklofenak sodyum grubunda negatif ve pozitif kontrol gruplarına göre canlılık, proliferasyon değerlerinin daha düşük, apoptoz düzeylerinin ise istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü.</p> <p>Sonuç: Çalışmamızla birlikte literatürde ilk kez hücre tabakaları kullanılarak oluşturulan üç boyutlu kolesteatom deney modeli ile diklofenak sodyumun kolesteatom üzerine etkinliği gösterildi. Ototoksik ve nörotoksik etkilerin çalışılması sonrasında bu molekül kolesteatom üzerinde kullanılabilir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Kolesteatom, primer hücre kültürü, diklofenak, 5-Fluourasil
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır