

**Laporan Penelitian****Hubungan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ )* dengan destruksi tulang akibat kolesteatoma**

**Sara Yosephine Aruan, Askaroellah Aboet, Devira Zahara, Aliandri,  
Abdul Rachman Saragih**

Departemen Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala Leher  
Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara/Rumah Sakit H. Adam Malik  
Medan

**ABSTRAK**

**Latar belakang:** Kolesteatoma merupakan penyakit yang menyebabkan destruksi tulang dan komplikasi yang berbahaya. *Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ )* merupakan sitokin utama yang terlibat dalam proses tersebut. **Tujuan:** Mengetahui hubungan ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan destruksi tulang akibat kolesteatoma pada penderita Otitis Media Supuratif Kronis (OMSK) tipe bahaya. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian analitik dengan menggunakan *cross sectional design*. Pemeriksaan imunohistokimia dilakukan untuk menilai ekspresi *TNF- $\alpha$*  pada kolesteatoma. **Hasil:** Ekspresi *TNF- $\alpha$*  yang positif/*over-expression* lebih banyak pada kelompok destruksi tulang derajat sedang yaitu sebanyak 57,9%. Terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan derajat destruksi tulang ( $p=0,001$ ). **Kesimpulan:** Terdapat hubungan antara ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan destruksi tulang akibat kolesteatoma pada penderita OMSK tipe bahaya.

**Kata kunci:** *TNF- $\alpha$* , Destruksi tulang, Kolesteatoma, OMSK

**ABSTRACT**

**Background:** Cholesteatoma is a disease which promotes bone destruction resulting in potentially serious complication. The *Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ )* is one of the main cytokine involved in this process. **Purpose:** To find out the relationship between *TNF- $\alpha$*  expression and bone destruction in dangerous type of CSOM. **Method:** This is a cross sectional analytical research. Thirty cholesteatoma samples were observed by immunohistochemical examination for *TNF- $\alpha$*  expression. **Result:** We found over-expression of *TNF- $\alpha$*  in the group with moderate bone destruction (57.9%). There was a significant difference between *TNF- $\alpha$*  expression with the degree of bone destruction ( $p=0,001$ ). **Conclusion:** There was an association between *TNF- $\alpha$*  expression with bone destruction in dangerous type of CSOM.

**Keywords:** *TNF- $\alpha$* , Bone destruction, Cholesteatoma, CSOM

**Alamat korespondensi :** Sara Yosephine Aruan, Departemen Ilmu Kesehatan THT-KL Divisi Otologi FK USU/RSUP. H. Adam Malik, Jl. Bunga Lau No. 17 Medan, kode pos: 20136. E-mail: sraruan@gmail.com.

## PENDAHULUAN

Otitis Media Supuratif Kronis (OMSK) merupakan penyakit yang sering terjadi di negara berkembang dan komplikasi yang menyertainya masih merupakan problem utama.<sup>1</sup> Di negara berkembang, masalah kemiskinan, rendahnya pengetahuan, kurangnya tenaga spesialis, dan akses pelayanan kesehatan yang terbatas memperburuk perjalanan penyakit dan komplikasi OMSK.

Prevalensi OMSK di negara berkembang dilaporkan sebesar 11%, sedangkan di negara maju sebesar 2%.<sup>2,3</sup> Menurut *World Health Organization*, pada tahun 2004 penderita penyakit ini di seluruh dunia berkisar antara 65-330 juta penderita, 60% di antaranya (39-200 juta) mengalami kematian dan 2 juta penderita mengalami kecacatan, 94% terdapat di negara berkembang.<sup>4</sup>

Prevalensi OMSK di Indonesia secara umum adalah 3,8% dan pasien OMSK merupakan 25% dari pasien-pasien yang berobat ke poliklinik THT di rumah sakit di Indonesia.<sup>5</sup> Di Departemen THT-KL RSUP H. Adam Malik Medan, 26% dari seluruh kunjungan merupakan penderita OMSK.<sup>6</sup> Suryanti dan Rukmini<sup>7</sup> pada penelitiannya di RSUD Dr. Soetomo Surabaya menemukan 331 penderita OMSK yang berobat periode Januari - Desember 2002.

Faktor risiko OMSK adalah lingkungan yang padat, higiene yang buruk, nutrisi yang kurang, tingginya koloni bakteri patogen di nasofaring, dan kurangnya pelayanan kesehatan.<sup>2</sup>

OMSK dibagi menjadi 2 tipe, yaitu tipe benigna dan tipe bahaya. OMSK tipe bahaya adalah OMSK yang mengandung kolesteatoma.<sup>8</sup> Saat ini, pembedahan adalah satu-satunya pengobatan yang efektif pada kolesteatoma.<sup>9</sup>

*TNF- $\alpha$*  merupakan sitokin proinflamasi utama pada proses destruksi tulang. *TNF- $\alpha$*

menyebabkan destruksi tulang dengan cara bekerja secara langsung dalam diferensiasi dan maturasi osteoklas, serta secara tidak langsung mengekspos matriks tulang.<sup>10</sup>

Penelitian yang berhubungan dengan ekspresi *TNF- $\alpha$*  terhadap derajat destruksi tulang akibat kolesteatoma belum pernah dilakukan di Indonesia. Dari uraian di atas, peneliti tertarik untuk melihat apakah ada hubungan antara ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan derajat destruksi tulang akibat kolesteatoma sehingga memungkinkan penatalaksanaan yang tepat terhadap kolesteatoma.

## METODE

Penelitian ini merupakan penelitian analitik dengan menggunakan *cross sectional design*. Populasi penelitian adalah seluruh penderita dengan diagnosis OMSK tipe bahaya yang ditegakkan berdasarkan anamnesis, pemeriksaan telinga, foto Rontgen mastoid/*CT-Scan* mastoid yang berobat di Sub Departemen Otologi THT-KL FK USU/RSUP H. Adam Malik Medan, dan dilakukan timpanomastoidektomi selama bulan Juni-Desember 2013. Sampel penelitian terkumpul sebanyak 30 kolesteatoma yang didapatkan selama operasi timpanomastoidektomi. Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ )* pada kolesteatoma diperiksa dengan teknik imunohistokimia menggunakan *mouse antihuman monoclonal antibodies (mAbs) TNF- $\alpha$*  dengan menilai pulasan sitoplasma yang berwarna coklat. Penilaian imunoreaktivitas *TNF- $\alpha$*  dinilai dengan mengalikan hasil skor luas dengan skor intensitas, sehingga didapatkan skor imunoreaktif *TNF- $\alpha$* . Skor luas dinilai: 0 jika tidak dijumpai sitoplasma berwarna coklat; 1 jika dijumpai sitoplasma berwarna coklat <10% jumlah sel; 2 jika dijumpai sitoplasma berwarna coklat 10-50% jumlah sel; dan 3 jika dijumpai sitoplasma berwarna coklat >50% jumlah sel. Skor intensitas

dihitung: 0=negatif; 1=lemah; 2=moderat; dan 3=kuat. Untuk skor akhir digunakan skor imunoreaktif. Skor imunoreaktif diperoleh dengan mengalikan skor luas dengan skor intensitas, dengan penilaian ekspresi *TNF- $\alpha$*  negatif=0–3 dan ekspresi *TNF- $\alpha$*  positif/*over-expression* =4–9.

Destruksi tulang akibat kolesteatoma berdasarkan klasifikasi Kuczkowski dkk.<sup>10</sup> yang dibagi menjadi derajat ringan: erosi skutum dan osikel; derajat sedang: destruksi tegmen dan seluruh osikel; dan derajat berat: destruksi seluruh osikel, tulang labirin, kanalis fasialis, dan liang telinga luar.

Analisis dilakukan dengan menggunakan data dalam bentuk tabel dan proporsi dihitung dengan persentase. Analisis bivariat digunakan untuk melihat hubungan antara variabel dengan menggunakan uji *Chi square* atau *Fisher's exact test* dan uji *Kruskal Wallis*.

## HASIL

Dari 30 pasien OMSK, ditemukan 28 (93,3%) penderita dengan ekspresi *TNF- $\alpha$*  positif/*over-expression*, sedangkan sebanyak 2 (6,7%) penderita dengan ekspresi *TNF- $\alpha$*  negatif.

**Tabel 1. Hubungan ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan kelompok usia**

| Ekspresi <i>TNF-<math>\alpha</math></i> | Usia (tahun)       |                          | Jumlah<br>n (%) |
|---|--------------------|--------------------------|-----------------|
|   | <16 tahun<br>n (%) | $\geq$ 16 tahun<br>n (%) |                 |
| Positif/ <i>over-expression</i>         | 6 (21,4)           | 22 (78,6)                | 28 (100,0)      |
| Negatif                                 | 0 (00,0)           | 2 (100,0)                | 2 (100,0)       |

p = 1,000

Ekspresi *TNF- $\alpha$*  yang positif/*over-expression* lebih banyak pada kelompok usia  $\geq$ 16 tahun sebanyak 22 (78,6%) penderita dan pada kelompok usia <16 tahun sebanyak

6 (21,4%) penderita. Dari uji *Fisher's exact* diperoleh nilai  $p=1,000$ , hal ini menunjukkan bahwa tidak ada hubungan yang bermakna antara ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan usia.

**Tabel 2. Hubungan ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan lama keluhan**

| Ekspresi <i>TNF-<math>\alpha</math></i> | Usia (tahun)       |                     |                    | Jumlah<br>n (%) |
|---|--------------------|---------------------|--------------------|-----------------|
|   | 0-5 tahun<br>n (%) | 6-10 tahun<br>n (%) | >10 tahun<br>n (%) |                 |
| Positif/ <i>over-expression</i>         | 7 (25,0)           | 11 (39,3)           | 10 (35,7)          | 28 (100,0)      |
| Negatif                                 | 0 (00,0)           | 1 (50,0)            | 1 (50,0)           | 2 (100,0)       |

p = 1,000

Ekspresi *TNF- $\alpha$*  yang positif/*over-expression* lebih banyak pada kelompok responden dengan lama keluhan 6-10 tahun, yaitu sebanyak 11 (39,3%) penderita. Dari

uji *Chi square* diperoleh nilai  $p=0,720$ . Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada hubungan yang bermakna antara ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan lama keluhan.

**Tabel 3. Hubungan ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan komplikasi OMSK tipe bahaya**

| Ekspresi <i>TNF-<math>\alpha</math></i> | Komplikasi              |                         | Jumlah<br>n (%) |
|---|-------------------------|-------------------------|-----------------|
|   | Komplikasi (+)<br>n (%) | Komplikasi (-)<br>n (%) |                 |
| Positif/ <i>over-expression</i>         | 22 (78,6)               | 6 (21,4)                | 28 (100,0)      |
| Negatif                                 | 0 (00,0)                | 2 (100,0)               | 2 (100,0)       |

p = 1,000

Ekspresi *TNF- $\alpha$*  yang positif/*over-expression* lebih banyak pada kelompok penderita OMSK tipe bahaya dengan komplikasi, yaitu sebanyak 22 (78,6%) penderita. Dari uji *Fisher's exact* diperoleh

nilai  $p=0,064$ . Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada hubungan yang bermakna antara ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan ada tidaknya komplikasi OMSK tipe bahaya.

**Tabel 4. Hubungan ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan derajat destruksi tulang**

| Ekspresi <i>TNF-<math>\alpha</math></i> | Derajat destruksi tulang |                 |                | Jumlah<br>n (%) |
|---|--------------------------|-----------------|----------------|-----------------|
|   | Ringan<br>n (%)          | Sedang<br>n (%) | Berat<br>n (%) |                 |
| Positif/ <i>over-expression</i>         | 0 (00,0)                 | 16 (57,1)       | 12 (42,9)      | 28 (100,0)      |
| Negatif                                 | 1 (50,0)                 | 1 (50,0)        | 0 (00,0)       | 2 (100,0)       |

$p = 1,000$

Ekspresi *TNF- $\alpha$*  yang positif/*over-expression* lebih banyak pada kelompok destruksi tulang derajat sedang, yaitu sebanyak 16 (57,1%) penderita diikuti derajat berat sebanyak 12 (42,9%)

penderita. Dari uji *Fisher's exact* diperoleh nilai  $p=0,001$ , hal ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan derajat destruksi tulang akibat kolesteatoma.

**Tabel 5. Hubungan skor imunoreaktivitas *TNF- $\alpha$*  dengan derajat destruksi tulang**

| Derajat destruksi tulang | Skor imunoreaktivitas <i>TNF-<math>\alpha</math></i><br>(rerata $\pm$ SB) |
|--------------------------|---|
| Ringan                   | 3 $\pm$ 0   |
| Sedang                   | 5,12 $\pm$ 1,11   |
| Berat                    | 9 $\pm$ 0   |

$p = 1,000$

Dari hasil analisis menggunakan uji *Kruskal Wallis* yang tercantum dalam tabel 5, ditemukan hubungan yang signifikan antara skor imunoreaktivitas *TNF- $\alpha$*  dengan derajat destruksi tulang ( $p=0,0001$ ).

*MMP-9* dan *TNF- $\alpha$*  pada kolesteatoma. Yetiser et.al seperti yang dikutip oleh Vitale dan Ribeiro<sup>9</sup> mendapatkan kadar *TNF- $\alpha$*  dan *IL-1* yang lebih tinggi pada pasien OMSK dengan kolesteatoma dibandingkan dengan OMSK tipe benigna.

## DISKUSI

Pada penelitian ini, dari 30 pasien OMSK ditemukan 28 (93,3%) penderita dengan ekspresi *TNF- $\alpha$*  positif/*over-expression*. Kuczkowski dkk.<sup>10</sup> mendapatkan kadar sitokin *TNF- $\alpha$*  yang tinggi pada kolesteatoma. Dibandingkan dengan kulit normal, kadar *TNF- $\alpha$*  pada kolesteatoma lebih tinggi 3,8 kali. Vitale dan Ribeiro<sup>9</sup> menyimpulkan dalam kolesteatoma *congenital* dan *acquired* dengan destruksi tulang dijumpai peningkatan kadar *TNF- $\alpha$* . Li dkk.<sup>12</sup> mendapatkan *over-expression*

Pada penelitian ini, diperoleh ekspresi *TNF- $\alpha$*  yang positif/*over-expression* lebih banyak pada kelompok usia  $\geq 16$  tahun sebanyak 22 (78,6%) penderita (Tabel 1). Dari uji *Fisher's exact* diperoleh nilai  $p=1,000$ . Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada hubungan yang bermakna antara ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan usia.

Gupta dkk.<sup>13</sup> menyatakan terdapat peningkatan produksi *TNF- $\alpha$*  selama proses penuaan pada manusia. Sastry dkk.<sup>14</sup> mendapatkan tidak terdapat korelasi antara umur pasien dengan kadar serum *TNF- $\alpha$*  serum penderita kolesteatoma, namun kadar

serum *TNF- $\alpha$*  berhubungan dengan perluasan destruksi tulang.

Pada penelitian ini, diperoleh ekspresi *TNF- $\alpha$*  yang positif/*over-expression* lebih banyak pada kelompok responden dengan lama keluhan 6-10 tahun yaitu sebanyak 11 (39,3%) penderita (Tabel 2). Dari uji *Chi square*, diperoleh nilai  $p=0,720$ . Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada hubungan yang bermakna antara ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan lama keluhan.

Penelitian Kuczkowski dkk.<sup>10</sup> terhadap pasien OMSK dengan kolesteatoma dan otitis media kronis granulomatosa tidak dijumpai hubungan secara statistik antara durasi penyakit dengan perluasan osteolisis, namun invasi kolesteatoma lebih luas pada pasien dengan penyakit lebih dari 1 tahun. Vitale dan Ribeiro<sup>9</sup> menyatakan perbedaan kadar *TNF- $\alpha$*  kemungkinan berhubungan dengan berbagai faktor seperti lama penyakit, intensitas infeksi lokal, serta adanya distribusi reseptor *TNF- $\alpha$*  pada matriks kolesteatoma, namun belum terdapat banyak publikasi yang menganalisis hipotesis ini.

Pada penelitian ini ekspresi *TNF- $\alpha$*  yang positif/*over-expression* lebih banyak pada kelompok penderita OMSK tipe bahaya dengan komplikasi, yaitu sebanyak 22 (78,6%) penderita (Tabel 4). Dari uji *Fisher's exact* diperoleh nilai  $p=0,064$ . Hal ini menunjukkan tidak ada hubungan yang bermakna antara ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan ada atau tidaknya komplikasi OMSK tipe bahaya.

Pada OMSK dengan kolesteatoma terjadi ketidak-seimbangan antara pembentukan dan resorpsi tulang. Peningkatan kadar sitokin proinflamasi dalam kolesteatoma menyebabkan eksaserbasi inflamasi kronis dan menyebabkan komplikasi. Perimatriks kolesteatoma mengandung limfosit, monosit, fibroblas, dan sel endotel yang merupakan sumber sitokin proinflamasi (*TNF- $\alpha$* , *IL-1*,

dan *IL-6*), imunoregulator (*IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-10*, *TGF- $\beta$* , dan *GM-CSF*), dan mediator lainnya (RANKL). Sitokin yang terdapat dalam kolesteatoma memainkan peranan penting dalam proliferasi sel basal epitel kolesteatoma, mengeluarkan enzim resorptif, dan mengaktifasi osteoklas. Osteoklas teraktivasi memegang peranan utama dalam proses osteolisis pada OMSK. Sitokin proinflamasi yang diproduksi oleh kolesteatoma dapat mengaktifasi osteoklas yang terlibat dalam osteolisis tulang, menstimulasi keratinosit dan sel endotel, dan mengaktifasi selektin dan integrin. Pada kolesteatoma terlihat peningkatan konsentrasi *TNF- $\alpha$* , *IL-1*, dan *IL-6*. Terlibatnya sitokin selama proses otitis media kronis dengan kolesteatoma telah dibuktikan pada beberapa penelitian.<sup>11</sup>

Di antara berbagai sitokin yang terlibat, *TNF- $\alpha$*  merupakan faktor utama yang berperan dalam resorpsi tulang dan menyebabkan komplikasi pada berbagai penyakit.<sup>10</sup>

Tidak dijumpainya hubungan yang bermakna antara ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan ada-tidaknya komplikasi OMSK tipe bahaya pada penelitian ini kemungkinan disebabkan sampel pada kelompok OMSK tanpa dan dengan komplikasi tidak tersebar merata.

Pada penelitian ini diperoleh ekspresi *TNF- $\alpha$*  yang positif/*over-expression* lebih banyak pada kelompok responden dengan destruksi tulang derajat sedang, yaitu sebanyak 16 (57,1%) penderita, diikuti derajat berat sebanyak 12 (42,9%) penderita (Tabel 5). Dari uji *Fisher's exact* diperoleh nilai  $p=0,001$ , hal ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan derajat destruksi tulang.

Kuczkowski dkk.<sup>10</sup> menemukan tingginya ekspresi *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\alpha$* , dan *IL-6* pada OMSK dengan kolesteatoma menunjukkan sifat destruktif kolesteatoma.

Adanya *IL-1 $\alpha$* , *TNF- $\alpha$* , dan *IL-6* pada kolesteatoma menunjukkan bahwa sitokin tersebut bisa menjadi faktor yang berperan pada peningkatan osteolisis tulang. Asumsi tersebut mendukung adanya korelasi positif kuat antara kadar sitokin dengan derajat destruksi tulang.<sup>11</sup> Vitale dan Ribeiro<sup>9</sup> menyebutkan *TNF- $\alpha$*  menyebabkan destruksi tulang dengan cara bekerja langsung dalam diferensiasi dan maturasi osteoklas, serta secara tidak langsung mengekspos matriks tulang. Penelitian oleh Li dkk.<sup>12</sup> mendapatkan *over-expression TNF- $\alpha$*  pada kolesteatoma berhubungan dengan destruksi osikel. Akimoto dkk.<sup>15</sup> menemukan korelasi yang kuat antara kadar *TNF- $\alpha$*  dalam jaringan kolesteatoma (baik *acquired* maupun *congenital*) dengan resorpsi tulang ( $r=0,76$  dan  $p<0,0001$ ).

*TNF- $\alpha$*  adalah sitokin proinflamasi yang merupakan salah satu faktor utama yang berperan terhadap resorpsi tulang, dan menyebabkan komplikasi pada berbagai penyakit. Pada penyakit kronis, ada kemungkinan untuk memutus inflamasi dengan menggunakan inhibitor *TNF- $\alpha$*  yang dapat mengurangi morbiditas dan mortalitas.<sup>10</sup>

Pada OMSK tipe bahaya terjadi akumulasi sel debris dan keratinosit diinvasi oleh sel-sel sistem imun termasuk sel Langerhans, sel-T, dan makrofag. Proses ini distimulasi oleh proliferasi epitel yang tidak seimbang, diferensiasi, maturasi keratinosit, dan pemanjangan apoptosis. Migrasi sel digantikan oleh hiperplasia dalam kondisi inflamasi. Inflamasi yang mendorong proliferasi epitel berhubungan dengan peningkatan ekspresi enzim litik dan sitokin seperti *TNF- $\alpha$*  yang sebagian diinduksi oleh antigen bakterial termasuk endotoksin seperti lipopolisakarida. *TNF- $\alpha$*  akan menstimulasi diferensiasi dan maturasi osteoklas atau dapat bereaksi pada matriks tulang, memaparkannya terhadap osteoklas. Hal ini akan menyebabkan degradasi matriks

ekstraselular tulang sehingga terjadi erosi atau destruksi tulang yang menyebabkan komplikasi OMSK tipe bahaya.<sup>16</sup>

Pada penelitian ini, didapatkan ekspresi *TNF- $\alpha$*  secara signifikan meningkat sesuai dengan derajat destruksi tulang, dan terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi *TNF- $\alpha$*  dengan derajat destruksi tulang akibat kolesteatoma, pada penderita OMSK tipe bahaya.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Viswanatha B, Naseeruddin K. Neurotologic complications of chronic otitis media with cholesteatoma. *J Neurol and Epidemiol.* 2013; 1:20-30.
2. Orji FT. A survey of the burden of management of chronic suppurative otitis media in developing country. *Ann Med Health Sci Res.* 2013; 3:4.
3. Ibekwe TS, Nwaorgu OG. Classification and management challenges of otitis media in a resource-poor country. *Niger J Clin Pract* 2011; 14(3):.262-9.
4. World Health Organization. Chronic suppurative otitis media. Burden of Illness and Management Options. Geneva: WHO; 2004.
5. Kelompok Studi Otologi PERHATI-KL. Panduan penatalaksanaan baku Otitis Media Supuratif Kronik (OMSK) di Indonesia, Jakarta, 2002.
6. Aboet A. Radang telinga tengah menahun. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar Tetap Bidang Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok Bedah Kepala Leher Universitas Sumatera Utara. Medan: USU e-Repository, 2008.
7. Suryanti DP, Rukmini. Abstrak. Otitis media supuratif kronik di Poli THT RS Soetomo Surabaya tahun 2002. Disampaikan pada Kongres Nasional XIII PERHATI-KL, Bali, 2003.
8. Chole DI, Nason R. Chronic otitis media and cholesteatoma. In: Snow JB, Wackym PA editors. *Ballenger's Otorhinolaryngology Head And Neck Surgery.* Connecticut: BC Decker Inc; 2009. p.217-27.

9. Vitale RF, Ribeiro FA. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2007; 73(1): 117-21.
10. Kuczkowski J, Sakowicz-Burkiewicz M, Izycka-Świeszewska E, Mikaszewski B, Pawełczyk T. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-6 and interleukin-10 in chronic otitis media with bone osteolysis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2011; 73(2):93-9.
11. Alves AL, Ribeiro FA. The role of cytokines in acquired middle ear cholesteatoma: literature review. *Rev Bras Otorrinolaryngol*. 2004; 70(6):813-8.
12. Li N, Qin Z, Dong M. The expression of matrix metalloproteinase-9 and tumor necrosis factor-alpha in cholesteatoma. *National Institutes of Health*. 2004; 18(7): 426-6.
13. Gupta S, Chiplunkar S, Kim C, Yell L, Gollapudi S. Effect of age on molecular signaling of TNF-alpha-induced apoptosis in human lymphocytes. *Mech Ageing Dev*. 2003; 124(4):503-9.
14. Sastry R, Sharma SC, Mann SBS, Ganguly NK, Panda N. Aural cholesteatoma: Role of Tumor necrosis factor alpha in bone destruction. *Am J Otol*. 1999; 20(2): 158-61.
15. Akimoto R, Pawankar R, Yagi T, Baba S. Acquired and congenital cholesteatoma: determination of tumor necrosis factor-alpha, intercellular adhesion molecule-1, interleukin-1 alpha and lymphocyte functional antigen-1 in the inflammatory process. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2000; 62(5):257-65.
16. Frickmann H, Zautner AE. Cholesteatoma—a potential consequence of chronic middle ear inflammation. *Otolaryngol*. 2012;5