

Laporan Penelitian

Pengaruh deksametason terhadap proliferasi sel, kadar IL- α , dan TNF- α pada biakan kolesteatoma**Ratna Dwi Restuti**Departemen Telinga Hidung Tenggorok – Bedah Kepala Leher
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia - Rumah Sakit Dr Cipto Mangunkusumo
Jakarta**ABSTRAK**

Latar belakang: Kolesteatoma merupakan suatu struktur berbentuk kantung, terdiri atas epitel gepeng berlapis yang selalu mengalami proses keratinisasi. Mengapa kolesteatoma bersifat invasif, hiperproliferatif, agresif, dan residif, hal ini perlu diselidiki. Deksametason merupakan salah satu kortikosteroid sintetik yang memiliki potensi tinggi sebagai preparat anti-inflamasi. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa pertumbuhan kolesteatoma dapat dihambat secara medikamentosa (dengan deksametason). **Metode:** Penelitian ini merupakan eksperimen yang dilakukan di laboratorium. Studi ini membandingkan 2 kelompok, yaitu kelompok biakan keratinosit kolesteatoma yang diberi deksametason sebagai kelompok perlakuan dan kelompok biakan yang tidak diberi perlakuan. **Hasil:** Pada penghitungan sel setelah 48 jam kultur dan 24 jam ditambahkan deksametason, terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang dimulai dengan dosis 10 μg . Pemberian dosis tertinggi, yaitu 100 μg menyebabkan kelompok dosis tersebut berbeda bermakna dengan semua kelompok lainnya. **Kesimpulan:** Dibuktikan bahwa tingkat reduksi sel berhubungan dengan penambahan dosis deksametason (*dose-dependent*). Deksametason dapat menghambat proliferasi sel pada biakan keratinosit kolesteatoma dengan dosis minimal 10 $\mu\text{g/mL}$.

Kata kunci: kolesteatoma, keratinosit, proliferasi sel, interleukin-1 α , *tumor necrosis factor- α*

ABSTRACT

Background: Cholesteatoma is a sac-shaped structure, arise from stratified squamous epithelium which is constantly undergoing process of keratinization. Why the nature of cholesteatoma is invasive, hyperproliferative, aggressive, and recurrent need to be studied. Dexamethasone is a synthetic corticosteroid which has a high anti-inflammatory action. **Objective:** The aim of this study was to prove that cholesteatoma growth can be inhibited medically by dexamethasone. **Methods:** This study was conducted as a laboratory experiment. We compared two groups, the first one were cholesteatoma keratinocyte cultures given dexamethasone as the treatment group and the second group were untreated cultures. **Results:** In cells counting after 48 hours of culture and 24 hours of dexamethasone administration, there was a significant difference between the control group and the treatment group that was started at a dose of 10 μg . The highest dose given group, 100 μg caused significant difference with all other groups. **Conclusion:** The rate of reduction of cells associated with the addition of dexamethasone dose (*dose-dependent*). Dexamethasone can inhibit cell proliferation in keratinocyte with minimal inhibitory dose of 10 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: Cholesteatoma, keratinocyte, cell proliferation, interleukin-1 α , *tumor necrosis factor- α*

Alamat korespondensi: Ratna Dwi Restuti, Department of ENT-HN Faculty of Medicine University of Indonesia – Cipto Mangunkusumo Hospital. E-mail: ratna.drest@gmail.com

PENDAHULUAN

Kolesteatoma merupakan suatu struktur berbentuk kantung, terdiri atas epitel gepeng berlapis yang selalu mengalami proses keratinisasi. Kolesteatoma bukan merupakan lesi neoplastik, tetapi bersifat destruktif.^{1, 2} Lima puluh persen dari otitis media supuratif kronik (OMSK) yang aktif berhubungan dengan kolesteatoma.³

Akhir-akhir ini sifat kolesteatoma banyak dipertanyakan, karena kolesteatoma bersifat invasif, hiperproliferatif, agresif, dan residif. Albino⁴ dalam penelitiannya menguji 3 dugaan tentang asal kolesteatoma, yaitu 1) sebagai induksi perubahan pra-neoplastik atau neoplastik; 2) sebagai akibat kegagalan/kesalahan proses penyembuhan luka (*wound healing*); 3) peran respons inflamasi lokal dan epitel normal mukosa telinga tengah serta bakteri.

Lapisan epidermis kolesteatoma terdiri atas keratinosit yang bersifat *potential idiopathic responsive* terhadap stimulus inflamasi. Respons tersebut menyebabkan diproduksinya berbagai sitokin, antara lain interleukin (IL-1, IL-6), *tumor necrosis factor* (TNF- α), dan *transforming growth factor* (TGF- α , TGF- β). Sitokin-sitokin tersebut memiliki kemampuan merangsang proliferasi, angiogenesis, destruksi tulang, serta pembentukan jaringan granulasi.⁴⁻⁶ Secara normal sitokin dihasilkan oleh sel makrofag, monosit, limfosit, dan epitel.⁷

Penelitian tentang pengaruh kortikosteroid terhadap kolesteatoma telah dilakukan pada hewan coba, yaitu tikus Wistar albino (*Wistar albino rats*). Dari penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa prednisolon, yang merupakan preparat kortikosteroid sintetik, dapat mengurangi kejadian inflamasi.⁸ Respons kolesteatoma terhadap kortikosteroid disebabkan karena sel keratinosit yang merupakan bagian terbesar dari sel-sel di epidermis memiliki reseptor kortikosteroid dengan afinitas tinggi.⁹ Reseptor tersebut

terletak di sitoplasma dan dapat berikatan dengan kortikosteroid.

Deksametason merupakan salah satu kortikosteroid sintetik yang memiliki potensi tinggi sebagai preparat anti-inflamasi. Selain efek anti-inflamasi yang kuat, deksametason juga memiliki lama kerja yang panjang. Kelebihan lain dari deksametason dibandingkan dengan preparat kortikosteroid sintetik lainnya adalah jarang menimbulkan efek sistemik yang ditimbulkan pada pemakaian topikal.^{10, 11}

Adapun tujuan umum penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa pertumbuhan kolesteatoma dapat dihambat secara medikamentosa (dengan deksametason). Sedangkan tujuan khusus penelitian ini adalah: mengetahui efek deksametason terhadap proliferasi sel pada biakan keratinosit kolesteatoma, efek deksametason terhadap produksi IL-1 α oleh keratinosit secara *in vitro*, mengetahui efek deksametason terhadap produksi TNF- α oleh keratinosit secara *in vitro*, dan mengetahui hubungan antara dosis deksametason dengan proliferasi sel, kadar IL-1 α , serta kadar TNF- α dalam medium biakan keratinosit kolesteatoma.

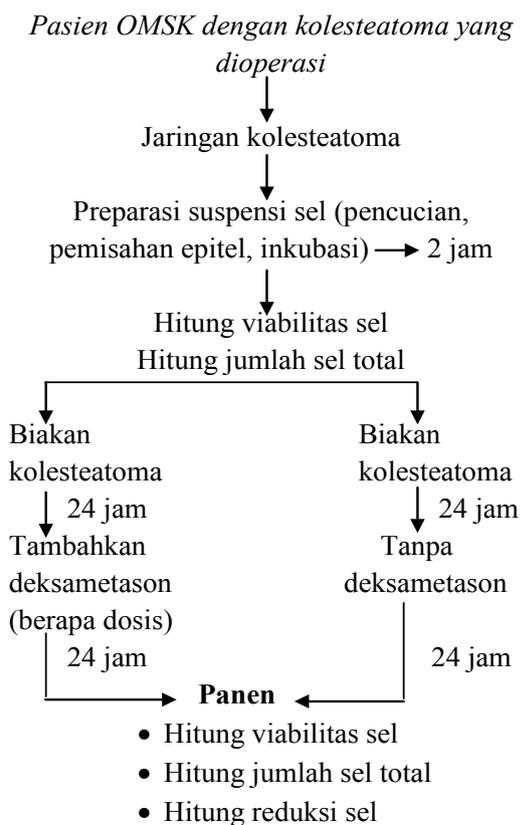
METODE

Penelitian ini merupakan eksperimen yang dilakukan di laboratorium. Studi ini membandingkan 2 kelompok, yaitu kelompok biakan keratinosit kolesteatoma yang diberi deksametason sebagai kelompok perlakuan dan kelompok biakan yang tidak diberi perlakuan.

Penelitian ini dilaksanakan pada periode Agustus 2002 sampai dengan Mei 2005. Penelitian mendapat izin dari Panitia Tetap Penilai Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Pengambilan jaringan kolesteatoma dilakukan pada saat operasi pasien OMSK dengan kolesteatoma di RSCM, RS Persahabatan, RSUD Tarakan, dan RS Salemba Satu Jakarta. Biakan keratinosit kolesteatoma dilakukan di Laboratorium Sitogenetika Keganasan Darah Sub. Divisi Hematologi

Onkologi Medik, Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI RS Dr. Cipto Mangunkusumo. Pemeriksaan kadar IL-1 α dan TNF- α dilakukan di Bagian Penelitian dan Pengembangan Laboratorium Prodia. Pengukuran kadar protein dilakukan di lembaga Eijkman Jakarta. Pemeriksaan mikrobiologi dilakukan di laboratorium Dept. Patologi Klinik RSCM. Untuk menghitung besar sampel yang diperlukan guna mengetahui efek hambatan deksametason terhadap produksi TNF- α digunakan rumus besar sampel untuk uji hipotesis terhadap nilai rerata dua populasi, dengan $n_1=n_2$, yaitu 13 pasien ~ 15 pasien per kelompok.

Biakan kolesteatoma untuk menghitung proliferasi sel

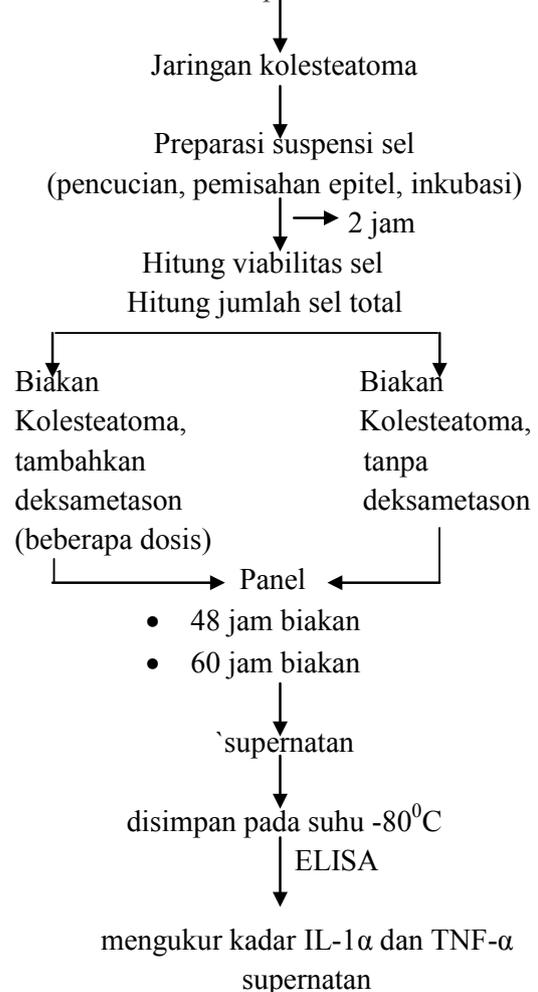


Kriteria inklusi adalah pasien OMSK dengan kolesteatoma yang berobat ke poliklinik THT pada beberapa rumah sakit di Jakarta dalam kurun waktu penelitian, bersedia diikutsertakan dalam penelitian dan pada saat operasi didapatkan jaringan kolesteatoma. Sedangkan kriteria eksklusi adalah pasien yang mendapat terapi kortikosteroid, baik tetes telinga maupun sistemik dalam kurun waktu 8 minggu sebelum operasi.

Prosedur biakan kolesteatoma dibagi menjadi 3 tahapan, yaitu 1) tahap preparasi suspensi sel; 2) tahap membiakan kolesteatoma;

Biakan kolesteatoma untuk mengukur kadar IL-1 α dan TNF- α supernatan

Pasien OMSK dengan kolesteatoma yang dioperasi



3) tahap memanen sel. Setelah pemanenan sel, dilakukan hitung sel menggunakan hemositometer *improved Neubauer*.

Bahan berasal dari supernatan biakan suspensi sel keratinosit kolesteatoma, baik dari kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Lama biakan setelah 48 jam dan 60 jam. Dosis deksametason yang diberikan pada kelompok perlakuan adalah 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; dan 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Kadar IL-1 α dan TNF- α diukur dengan cara ELISA sesuai prosedur pada kit.^{10, 11}

HASIL

Sebelum penelitian, dilakukan penelitian pendahuluan yang bertujuan untuk mencari metode teknis kultur dan menghitung sampel hitung sel.

Tabel 1. Karakteristik sampel hitung sel dan pengukuran kadar IL-1 α dan TNF- α

Parameter	Karakteristik	Jumlah
Jenis kelamin	• Laki-laki	10
	• Perempuan	5
Kelompok usia (tahun)	• 0-10	0
	• >10-20	6
	• >20-30	7
	• >30-40	1
	• >40-50	1
Riwayat keluar cairan	• < 5 tahun	1
	• 5-10 tahun	3
	• > 10 tahun	11

Pada tabel 1 tampak sebaran karakteristik sampel terbanyak laki-laki, sebagian besar sampel (13 dari 15 sampel) berusia 10 – 30 tahun. Terdapat keluhan otore pada 11 dari 15 sampel. Saat operasi, pada 13 dari 15 sampel tidak ditemukan osikel (tulang pendengaran).

Proliferasi sel pada masing-masing kelompok dosis deksametason

Setelah 48 jam sejak dikultur atau sejak 24 jam ditambahkan deksametason pada kelompok perlakuan, selanjutnya dilakukan pemanenan. Masing-masing kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan dihitung jumlah selnya untuk mengetahui tingkat proliferasi.

Dengan uji Anova dan didapatkan nilai $p < 0,001$. Untuk itu analisis dilanjutkan dengan *pairwise comparison*, dan didapat nilai p seperti pada tabel 2.

Tabel 2. Matriks nilai p^* perbandingan rerata jumlah sel antar kelompok dosis

Dosis (μg)	0	1	10	40	80	100
0	-					
1	0,862	-				
10	0,034	0,059	-			
40	0,003	0,182	1,000	-		
80	0,001	0,133	0,468	0,490	-	
100	0,001	0,008	0,016	0,008	0,041	-

* nilai p sudah dilakukan koreksi Bensferoni

Dengan mengambil batas kemaknaan 0,05; dari matriks tersebut tampak bahwa kelompok kontrol berbeda bermakna dengan semua kelompok dosis, kecuali kelompok dosis 1 μg . Kelompok dosis 100 μg berbeda bermakna dengan semua kelompok lainnya.

Reduksi sel

Untuk mengetahui kemaknaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dilakukan uji Anova dan didapat nilai $p = 0,004$. Analisis kemudian dilanjutkan dengan *pairwise comparison*, dengan nilai p seperti pada tabel 3.

Tabel 3. Matriks nilai p^* perbandingan rerata reduksi sel antar kelompok dosis

Dosis (μ g)	1	10	40	80	100
1	-				
10	0,025	-			
40	0,173	1,000	-		
80	0,129	0,442	0,313	-	
100	0,007	0,012	0,002	0,103	-

*nilai p sudah dilakukan koreksi Bensferoni

Dengan mengambil batas kemaknaan 0,05; dari matriks tersebut tampak bahwa tingkat reduksi berbeda bermakna pada dosis 1 μ g dibanding dengan dosis 10 μ g, dan dosis terbesar yaitu 100 μ g. Dosis 100 μ g berbeda bermakna dengan semua kelompok dosis lain, kecuali dengan dosis 80 μ g.

Viabilitas sel

Sebelum tanam sel dilakukan penghitungan sel dan viabilitas sel dalam suspensi secara duplo. Setelah kultur 48 jam dilakukan panen, dan dihitung viabilitas sel pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Rata-rata viabilitas sel saat ditanam 92,95%, sedangkan viabilitas saat panen setelah kultur 48 jam viabilitasnya 96,60%. Dengan uji-t berpasangan, kedua nilai tersebut berbeda bermakna, dengan nilai $p=0,012$. Selanjutnya dihitung rerata viabilitas sel antar kelompok dosis.

Dengan uji Anova didapatkan $p=0,004$, sehingga analisis dilanjutkan dengan *pairwise comparison*, dan didapat nilai p seperti pada tabel 4.

Tabel 4. Matriks nilai p^* perbandingan viabilitas sel antar kelompok dosis

Dosis(μ g)	0	1	10	40	80	100
0	-					
1	1,000	-				
10	0,096	0,793	-			
40	0,008	0,049	1,000	-		
80	0,051	0,193	1,000	1,000	-	
100	0,002	0,004	0,601	0,304	0,027	-

* nilai p sudah dilakukan koreksi Bensferoni

Dengan mengambil batas kemaknaan 0,05; dari matriks terlihat bahwa viabilitas sel berbeda bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok dosis 40 μ g dan dosis 100 μ g, antara dosis 1 μ g dengan dosis 100 μ g, serta antara 80 μ g dan 100 μ g.

Pengukuran kadar IL-1 α dan TNF- α

Dengan uji statistik Anova didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna kadar IL-1 α antar kelompok.

Tabel 5. Perbandingan rerata kadar IL-1 α antar dosis dalam kultur 60 jam

Dosis deksa- metason (μ g)	Rerata kadar IL-1 α \pm SD (pg/ml)	Median (minimum- maksimum)	P
Kontrol	6,32 (2,56)	6,27 (2,84-10,31)	0,949
1	6,32(3,07)	6,44 (2,22-11,15)	
10	6,61(3,07)	7,53 (2,04-11,21)	
100	6,61(3,21)	5,64 (2,78-12,75)	

Pada tabel 5 tampak bahwa rerata kadar IL-1 α antar dosis deksametason hampir tidak berbeda. Dengan uji Anova didapatkan hasil tidak berbeda bermakna antar kelompok dosis deksametason.

Dari data tersebut tampak bahwa kelompok dosis perlakuan memiliki kadar TNF- α kurang dari kelompok kontrol. Pemberian deksametason menyebabkan penurunan kadar TNF- α . Setelah dinalisis dengan uji Anova perbedaan tersebut tidak bermakna.

Tabel 6. Perbandingan rerata kadar TNF- α antar dosis dalam kultur 60 jam

Dosis deksa- metason (μ g)	Rerata kadar TNF- α \pm SD (pg/ml)	Median (minimum- maksimum)	p
Kontrol	24,63 (8,53)	22,19 (17,35-36,80)	0,591
1	14,60 (3,45)	14,77 (10,33-18,54)	
10	11,61 (4,45)	10,17 (8,25-17,83)	
100	15,95 (7,18)	15,43 (9,15-23,81)	

Secara umum nilai rerata antar kelompok dosis cenderung turun dibanding dengan kelompok kontrol. Perbedaan tersebut tidak bermakna setelah dilakukan uji Anova. Namun demikian data pada tabel 10 memperlihatkan perbedaan yang mencolok antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (dosis 1 μ g, 10 μ g, dan 100 μ g). Ini berarti bahwa terdapat penurunan kadar TNF- α dengan pemberian deksametason.

DISKUSI

Hampir sebagian besar sampel merupakan usia produktif dan usia sekolah dasar-menengah. Kolesteatoma pada anak-anak bersifat lebih cepat pertumbuhannya (progresif). Browning³ menuliskan dari penelitiannya pada pasien otitis media, bahwa prevalens OMSK pada usia 18-40 tahun sebesar 2,1%. Kejadian OMSK berkaitan dengan usia, kekerapan menderita infeksi saluran napas, status gizi, dan status sosial ekonomi.

Pada sampel untuk hitung sel, 11 dari 15 sampel mengalami durasi otore lebih dari 10 tahun, sedangkan pada sampel untuk pengukuran kadar TNF- α dan IL-1 α 13 dari 15 sampel mengalami otore lebih dari 10 tahun. Lama sakit lebih dari 10 tahun pada OMSK dengan kolesteatoma dapat menyebabkan berbagai komplikasi dan destruksi tulang ke organ di sekitarnya, misalnya tegmen fossa serebri media, fossa posterior, dan sinus sigmoid. Pasien OMSK dengan destruksi ke organ sekitarnya menunjukkan bahwa sudah pada stadium 5-6. Destruksi tulang terjadi karena sifat kolesteatoma yang hiperproliferatif, mampu berangiogenesis, dan bersifat destruktif.^{4, 12}

Pada penghitungan sel setelah 48 jam kultur dan 24 jam ditambahkan deksametason, terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang dimulai dengan dosis 10 μ g. Pemberian dosis

tertinggi, yaitu 100 μ g menyebabkan kelompok dosis tersebut berbeda bermakna dengan semua kelompok lainnya. Dapat disimpulkan bahwa tingkat reduksi sel berhubungan dengan penambahan dosis deksametason (*dose-dependent*).

Di tingkat sel, kortikosteroid dalam hal ini deksametason berikatan dengan reseptor yang terletak di sitoplasma. Selanjutnya terbentuk kompleks reseptor-kortikosteroid yang berjalan ke inti sel. Di dalam inti sel kortikosteroid mempengaruhi regulasi proses transkripsi dan post-transkripsi, menghambat gen transkripsi, dan memiliki efek pada stabilitas mRNA.¹³

Dorscheid¹⁴ meneliti kultur epitel saluran napas dan memberi perlakuan dengan deksametason. Dalam tulisannya ia menyimpulkan bahwa dengan pemberian deksametason ke dalam media kultur, terjadi kerusakan polaritas mitokondria. Kerusakan tersebut mulai terjadi pada jam ke-1 dan kerusakan secara bermakna terjadi dalam 4 jam setelah kultur. Selain melalui mekanisme kerusakan mitokondria, deksametason juga menyebabkan apoptosis primer epitel saluran napas. Penelitian tersebut juga menghubungkan antara deksametason dengan tingkat survival sel dan proliferasi sel. Ia mendapatkan terjadi inhibisi siklus sel yang diindikasikan dengan peningkatan propidium iodide hipotonik. Dengan pemberian deksametason siklus sel terhenti pada fase G1/ S.

Pada penelitian ini pemberian deksametason dengan berbagai dosis tidak menyebabkan penurunan kadar IL-1 α . Hal ini kemungkinan dapat disebabkan oleh tidak terdeteksinya kadar IL-1 α pada beberapa sampel. Tidak terdeteksinya IL-1 α dapat juga berarti memang kadar IL-1 α sangat kecil, kurang dari nilai standard minimal. Reagen ELISA untuk pengukuran kadar IL-1 α tidak tersedia jenis hipersensitif (HS), yaitu jenis reagen yang dapat mendeteksi kadar IL-1 α dengan konsentrasi yang sangat kecil, yaitu kurang dari 1 μ g/ml.

Pada penelitian ini terlihat bahwa kadar TNF- α kelompok kontrol lebih tinggi dari kelompok perlakuan deksametason dalam berbagai dosis dengan perbedaan yang cukup mencolok (tabel 10). Perbedaan kadar TNF- α rata-rata antar kelompok dosis perlakuan tidak terlalu besar seperti halnya dengan kelompok kontrol.

Banyak faktor yang mempengaruhi pembentukan TNF- α di tingkat sel. Hal tersebut terjadi mulai dari reseptor kortikosteroid di sitoplasma, proses dimerisasi setelah reseptor tersebut berikatan dengan sekuens tertentu di DNA, yang disebut *glucocorticoid receptors element* (GRE), dan protein faktor-faktor transkripsi yang berikatan. Apabila reseptor kortikosteroid berikatan dengan protein yang bersifat sebagai koaktivator, maka akan terjadi aktivasi proses transkripsi gen TNF- α . Sebaliknya jika berikatan dengan korepresor maka akan terjadi inhibisi proses transkripsi gen TNF- α .

Dalam kaitannya dengan TNF- α diduga deksametason dapat menghambat proses transkripsi protein. Hal ini dibuktikan oleh Zhang¹⁵ dalam penelitiannya yang menuliskan bahwa kortikosteroid dapat menghambat proses diferensiasi dan lipogenesis pada jaringan lemak, serta menyebabkan apoptosis sel.

Sebagai kesimpulan, deksametason dapat menghambat proliferasi sel pada biakan keratinosit kolesteatoma. Peningkatan dosis deksametason hingga 100 $\mu\text{g/mL}$ menambah efek penurunan proliferasi sel. Dosis minimal yang dapat menghambat proliferasi sel adalah dosis 10 $\mu\text{g/mL}$. Deksametason tidak terbukti menurunkan produksi IL-1 α , serta dapat menurunkan TNF- α pada biakan selama 60 jam, yang terjadi pada dosis 100 $\mu\text{g/mL}$.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ferlito A. A review of definition, terminology and pathology of aural cholesteatoma. *J Laryngol Otol* 1993; 107:483-8.
2. Strunk CL. Cholesteatoma. In: Bailey BJ, editor. *Head and Neck Surgery Otolaryngology*. Philadelphia: Lippincot Company; 1998. p. 2041-51.
3. Browning GG. Aetiopathology of inflammatory conditions of the external and middle ear. In: Kerr AG, editor. *Scott-Brown's Otolaryngology*. 6 ed. Landon: Butterworth; 1997. p.1-37.
4. Albino AP, Kimmelman CP, Parisier SC. Cholesteatoma: A molecular and cellular puzzle. *Am J Otol* 1998; 19:7-29.
5. Marenda SA, Aufdemorte TB, Antonio S. Localization of cytokine in cholesteatoma tissue. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 112:359-68.
6. Ergun S, Zheng Z, Carlsoo B. Expression of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in middle ear cholesteatoma. *Am J Otol* 1996; 112:750-4.
7. Denburg JD. Cytokine and inflammatory cells. In: Munksgaard. ed. *Nasal polyposis*; 1997. p. 79-87.
8. Sennaroglu L, Ozkul A, Gedikoglu G. Effect of intratympanic steroid application on the development of experimental cholesteatoma. *Laryngoscope* 1998; 108:543-7.
9. Ponc M, Kempenaar JA, Kloet RD. Corticoids and cultured human epidermal keratinocytes: specific intracellular binding and efficacy. *J Invest Dermatol* 1981; 76:211-4.
10. American Society of Health-System Pharmacists. *Anti-inflammatory Agents*. AHFS Drug Information, 2001. p.2666-3398.
11. Schimmer BP, Parker KL. Adrenocorticotrophic hormone: sdrenocortical steroids and their synthetic analogs, inhibitors of adrenocortical steroids biosynthesis. In: Gilman AG, Rall TW, editors. *Murad F Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutic*. 7 ed. New York: Mc Millan Publishing Co; 2001. p.1649-77.
12. Bluestones CD. Definitions, terminology, and classification. In: Rosenfeld RM, Bluestone, editors. *Evidence-based Otitis Media*. London: BC. Decker Inc; 1999. p. 85-103.

13. Loy AHC, Tan AL, Lu PKA. Microbiology of chronic suppurative otitis media in Singapore. *Sing Med J.* 2002; 43(6):296-9.
14. Dorscheid DR, Wojcik KR, Marroquin B, White SR. Apoptosis of airway epithelial cells induced. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1940-7.
15. Zhang HH, Kumar S, Barnett AH, Eggo MC. Dexamethasone inhibits tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and interleukin-1 α release in human subcutaneous adipocytes and preadipocytes and preadipocytes *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(6):2817-24.