

T.C.
ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN PERFORE
KULAK ZARI İYİLEŞMESİNE ETKİSİ
DENEYSEL ÇALIŞMA

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emre ERKİLET

SAMSUN 2008

T.C.
ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN PERFORE
KULAK ZARI İYİLEŞMESİNE ETKİSİ
DENEYSEL ÇALIŞMA

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emre ERKİLET

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet KOYUNCU

SAMSUN 2008

TEŐEKKÜR

Çalışmamızda ratların kulak zarlarının histopatolojik değerlendirme aőaması Veteriner Fakóltesi Patoloji Anabilim Dalı'na yapılmıştır. Katkılarından dolayı Veteriner Fakóltesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Murat Yarım'a teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
MATERYAL VE METOD.....	17
BULGULAR	20
TARTIŞMA.....	31
SONUÇLAR	37
ÖZET	38
KAYNAKLAR	39

GİRİŞ VE AMAÇ

Kulak zarı perforasyonları travma, blast etki ve çoğunlukla da orta kulak enfeksiyonları sonucu ortaya çıkan klinik bir bulgudur. Görülme sıklığı %1'in altında bildirilmesine rağmen gerçek insidansın daha fazla olduğu tahmin edilmektedir.^{39,56} Kulak zarı perforasyonları iletim tipi işitme kayıplarının en önemli nedenlerindedir ve gerek işitmenin sağlanması, gerekse orta ve iç kulağın dış etkilerden korunması açısından kısa sürede tedavi edilerek zar bütünlüğünün yeniden sağlanması gerekir. Kulak zarında oluşan perforasyonlar genellikle hastalığın medikal tedavisi sonrasında düzelmesine rağmen bazen perforasyonlar kapanmamakta ve değişik tedavi yöntemleri gerektirebilmektedir.^{20,31,47,63}

Cerrahi tedavi gerek morbiditenin yüksek olması, gerekse fiziki şartların her zaman sağlanamaması nedeniyle kolaylıkla uygulanamamaktadır. Bu nedenle kulak zarı perforasyonlarının tedavisinde daha kolay, ucuz ve daha az invaziv yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.^{20,63}

Kulak zarı perforasyonlarının tedavisinde cerrahi dışında hyaluronan, heparin, epidermal growth faktör, fibroblast growth faktör, platelet derived growth factor, transforming growth factor gibi değişik moleküller kullanılmıştır.^{20,47,53,56}

Trombositler kanın şekilli elemanlarından olup hemostazda ve içerdikleri büyüme faktörleri nedeniyle yaralı dokuların iyileşmesinde önemli rol oynarlar. Trombositlerin α -granülleri içinde yara iyileşmesinde oldukça güçlü etki gösteren birçok büyüme faktörü bulunur. Yüksek konsantrasyonda trombosit içeren küçük bir plazma volümü trombosit zengin plazma (TZP) olarak adlandırılır. Trombosit zengin plazmanın cerrahi sahaya uygulanmasından sonra aktivasyonunu takiben, trombositlerin α -granüllerinden çevre dokulara yüksek konsantrasyonda büyüme faktörü salınır. Trombosit zengin plazmanın kalsiyum klorid ile karıştırılması, α -granüllerinin degranülasyonuna ve trombositlerden büyüme faktörlerinin salınmasına yol açan ve yaraya dışarıdan uygulanabilecek jel formu ile sonuçlanacaktır.^{8,12,13,15,19,50}

Trombosit zengin plazma zar perforasyonlarının kapanmasına katkısı olan otolog bir maddedir.

Çalışmamızda perforasyon oluşturduğumuz rat kulak zarlarına lokal uygulanan trombositten zengin plazmanın perforasyon kapanmasına olan etkisini, perforasyonun kapanma süresi ve histopatolojik değerlendirme yardımıyla inceledik.

GENEL BİLGİLER

1- KULAK ANATOMİSİ

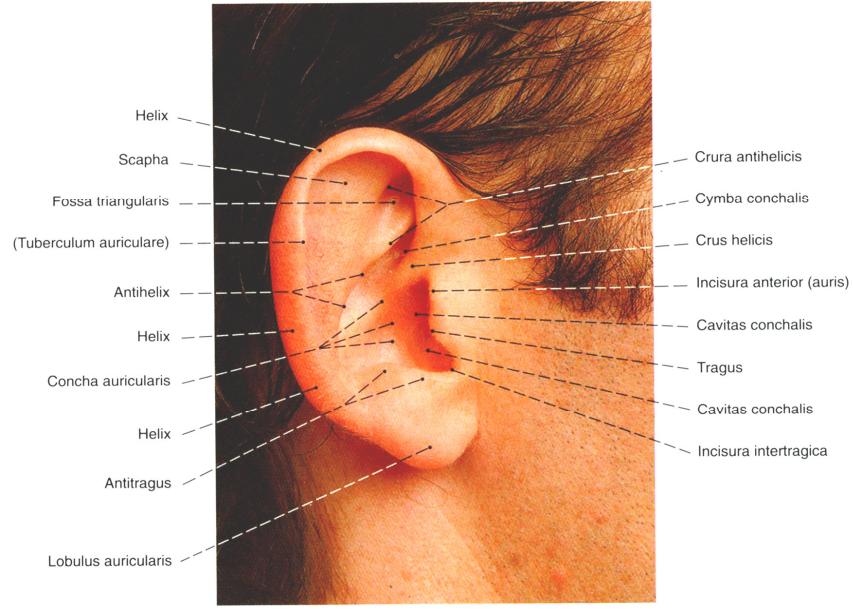
Kulak anatomisi dış, orta ve iç kulak olmak üzere üç bölümde ele alınır.

A- Dış Kulak

Dış kulak, aurikula ve dış kulak yolundan meydana gelir.

Aurikula

Aurikula cilt ve üzeri perikondriumla kaplı kıkırdaktan oluşur. İskeletini cartilago auriculae denilen bir kıkırdak yapar. Sadece lobulus auriculae denilen ve kulağın alt ucunu yapan kısımda kıkırdak bulunmaz. Dış yüzde düzensiz çukurlar ve çıkıntılar bulunur. Ortada bulunan ve dış kulak yolu ile devam eden çukura concha auricularis denir. Bu çukur crus helicis tarafından ikiye bölünür. Üstte kalan kısım cymba concha, altta kalan kısım ise cavum concha adını alır. Çukurun önünde tragus, arkasında ise antitragus adlı bir çıkıntı vardır. İki çıkıntı arasında meydana gelen çentiğe incisura intertragica adı verilir. Cavum concha arka ve üst kısımlarda yarım daire biçiminde bir çıkıntı ile sınırlanır. Bu yapıya antiheliks denir. Antiheliks üst kısımda iki parçaya ayrılır. Bunlara crura antihelicis adı verilir ve aralarında oluşan üçgen çukur şeklindeki alana da fossa triangularis denir. Aurikula kıkırdağı serbest kenarı, üstte ve arkada öne doğru çevrilir ve bir kabartı yapar. Buna heliks denir. Heliks kendi üzerine kıvrılıp ilerlediği için oluşan girintiye de fossa scaphoidea adı verilir.^{2,9,11,46}



Şekil 1. Aurikula⁵²

Aurikulanın anterior, posterior ve süperior olmak üzere üç adet ligamenti, M. Auricularis superior, M. Auricularis posterior ve M. Auricularis anterior olmak üzere de üç adet ekstrensek kası vardır. Aurikula bu kas ve ligamentlere ek olarak deri, dış kulak yolu kıkırdağı ve intrinsek kaslar ile bağlıdır.^{2,9,11,46}

Aurikulanın arteriyel kanlanması eksternal karotid arter dallarından olur. A. Auricularis posterior mastoid çıkıntının ön yüzü boyunca seyrederek ve aurikulanın arka kısmının beslenmesini sağlar. A. Temporalis superficialis ise aurikulayı önden besler. Aurikulanın venleri, arterlere eşlik ederek internal juguler vene drene olur.^{2,11}

Aurikulanın lenfatik drenajı parotid, retroauriküler ve yüzeysel servikal lenf nodlarına olmaktadır.²

Aurikulanın sensoriyal innervasyonu 5., 7., 9. ve 10. kranial sinirler ve 2-3. servikal sinirden sağlanır.¹¹

Dış Kulak Yolu

Dış kulak yolu, cavum conchadan kulak zarına kadar olan bölümdür. Arka duvarın uzunluğu yaklaşık 25 mm, ön duvarın uzunluğu ise 30 mm civarındadır. Aradaki 5 mm'lik fark kulak zarının oblik yerleşmesinin sonucudur. Dış kulak yolunun çapı yaklaşık olarak 7–9 mm kadardır. Kanal içe anteroinferior yönde seyrederek ve hafif

“S” şeklini alır. Dış 1/3 kısmı kıkırdak, iç 2/3 kısmı kemikten oluşur. Dış kulak yolunun kıkırdak parçasının ön duvarında Santorini fissürleri adı verilen iki yarık bulunur. Bunlar dış kulak yolunun esnekliğini artırırlar, ancak infeksiyonların yayılmasına da olanak tanırırlar.^{2,9,11}

Dış kulak yolunu örten deri kıkırdak kısımda kalındır ve kıl, yağ ve serümen bezlerini içerir. İçe doğru gittikçe deri incelik ve kemik kısımda bu yapılar görülmez. Zira doğru deri daha da incelerek zar üzerinde sadece epidermis tabakası halini alır.^{2,46}

Dış kulak yolunun arteriyel kanlanması, aurikulyayı besleyen arterlere ek olarak A. Maksillaris interna' nın derin aurikuler dalı ile olmaktadır. Lenfatikleri aurikulanın lenfatikleri ile aynıdır.^{2,11}

B- Kulak Zarı

Kulak zarı; dış kulak yolu ile orta kulak boşluğunu birbirinden ayıran ve orta kulak boşluğunun dış duvarının büyük kısmını yapan, 0.1 mm kalınlığında, 10–11 mm uzunluğunda, 8–9 mm genişliğinde, inci renginde bir yapıdır. Zarın uç kısımları dış kulak yolunun kemik parçasının medial ucuna yapışmıştır. Kulak zarı oblik yerleşim gösterir. Bu nedenle kulak zarının üst kenarı, alt kenarına oranla 6 mm kadar daha dışarıdadır.^{2,46}

Kulak zarının orta kısmı içeriye doğru çökmüş durumdadır ve bu çöküntünün en derin noktasına umbo denir. Umbodan yukarıya doğru ilerleyen, manibrium malleinin zarda meydana getirdiği kabartıya stria mallearis adı verilir. Stria mallearis yukarıda malleusun processus lateralis parçasının oluşturduğu, prominentia mallearis adı verilen bir çıkıntı ile sonlanır. Prominentia mallearisten öne ve arkaya doğru plica mallearis anterior ve posterior uzanır. Bu plikalar kulak zarını iki parçaya ayırır. Üstte kalan parçaya pars flaksida, altta kalan parçaya ise pars tensa adı verilir. Pars tensanın ön alt tarafında umbodan başlayarak öne ve aşağıya doğru zarın kenarına kadar uzanan üçgen tarzında aydınlık bir alan görülür. Bu alana Politzer üçgeni adı verilir.^{2,46}

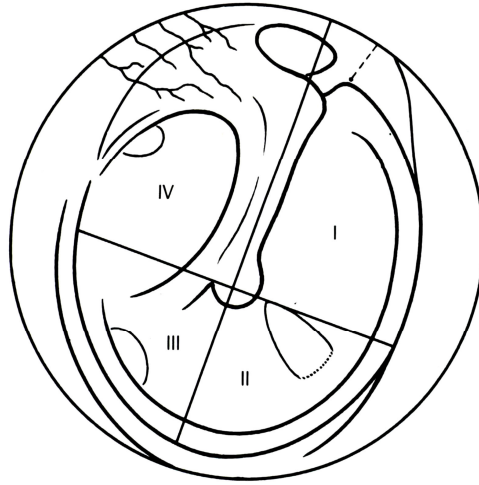
Pars tensa kenarlarda anulus fibrocartilagineus adı verilen bir halka aracılığı ile dış kulak yolunun sonunda anulus tympanicus üzerinde bulunan sulcus tympanicusa yapışır. Dış kulak yolunun üst kısmında anulus tympanicus yoktur, burada halkanın uçları arasında meydana gelen çentiğe incisura tympanica adı verilir. Çentiğin

kenarlarında pars tensayı çevreleyen fibrokartilajinöz halkanın uçları kemikten ayrılır ve zarın iç yüzünde malleusun kısa kolu üzerinde birleşir. Fibrokartilajinöz halkanın bu uçları plica mallearis anterior ve posterioru oluşturan kısımdır.^{2,46}



Şekil 2. Kulak zarı

Kulak zarı topografik olarak dört bölgeye ayrılır. Stria mallearisten geçen çizgi ve umbodan buna dik ikinci bir çizgi kulak zarını I: ön-üst, II: ön-alt, III: arka-alt ve IV: arka-üst olmak üzere dört bölgeye ayırır.^{2,46}



Şekil 3. Kulak zarı topografisi⁵²

Kulak zarının kanlanması lamina propria ile bağlantısı olan epidermal ve mukozal yüzeylerden gelen kan damarları ile sağlanır. Kulak zarının dış yüzünün arteriyel kanlanması internal maksiller arterin bir dalı olan derin aurikuler arter, iç yüzünün kanlanması ise posterior aurikuler arter ve timpanik arter ile olur. Kulak zarının venleri arterlere eşlik eder.^{2,11,46}

Kulak zarının duyuusal innervasyonu N. Trigemini'nin n. mandibularis dalına ait aurikulotemporalis dalı, N. Vagus'un aurikuler dalı, N. Fasialis'in aurikuler dalı ve N. Glossofaringeus'un timpanik dalı tarafından sağlanır.^{2,11,46}

C- Orta Kulak

Orta kulak, kulak zarı ile kemik labirent arasında muköz membran ile kaplanmış kemik mesafedir. Ön arka çapı yaklaşık 15 mm'dir. İç derinliği ise yukarı kısımlarda 6 mm, umbo çevresinde ise 2 mm kadardır. Orta kulak boşluğunda dış kulaktan iç kulağa ses dalgalarının iletimini sağlayan malleus, inkus ve stapes denilen üç adet kemikçik vardır. Bu kemikçikler orta kulak boşluğunda kulak zarı ile iç kulağın fonksiyonel girişi olan oval pencere arasında bir köprü oluşturur.^{2,5}

Orta kulak boşluğunun altı adet duvarı bulunur. Tavanı tegmen timpani adını alır ve orta kulak boşluğunu orta kafa çukurundan ayırır. Tabanı ise ince kemikten oluşmuştur ve ön-alt kısımda A. Carotis interna ile, arka-alt kısımda ise juguler bulbusla yakın komşuluktadır. Orta kulak boşluğunun arka duvarı aditus ad antrum vasıtasıyla mastoid antrum ve hava hücreleri ile devamlılık gösterir. Orta kulak boşluğu önde östaki tüpü aracılığıyla nazofarenks ile ilişkilidir. Orta kulak boşluğunun dış duvarı kulak zarı ile epitimpanik resesin yan duvarı tarafından oluşturulmuştur. Orta kulak boşluğu, kulak zarı tarafından topografik olarak mezotimpanum, hipotimpanum ve epitimpanum adı verilen üç kısma ayrılır. İç duvarın en önemli yapılarından biri kokleanın bazal turunun yan duvarının yaptığı kabarıklık nedeni ile dışa doğru bombeliği ile oluşan promontoryumdur. Orta kulak boşluğunun iç duvarındaki diğer önemli yapılar stapes tabanının oluşturduğu oval pencere ile koklear kapsülün orta kulak boşluğuna diğer açılım yeri olan yuvarlak penceredir.^{2,5,46}

Orta kulak boşluğunun arteriyel kanlanması internal maksiller arterin anterior timpanik dalı, posterior aurikuler arterin stilomastoid dalı, orta meningeal arterin ramus

petrosus ve ramus timpanikus superior dalları ve internal karotid arterin karotikotimpanik dalları ile sağlanır. Venöz drenaj pterigoid venöz pleksusa ve superior petröz sinüse olur. Lenfatik drenajı parotid ve retrofaringeal lenf nodlarına olmaktadır.^{2,9,11}

Orta kulağın duyuşal innervasyonu pleksus timpanikus tarafından sağlanır. Pleksus timpanikus, glossofarengeal sinirin timpanik dalı ve karotikotimpanik sempatik sinirler tarafından oluşturulur.^{2,5,11}

D- İç Kulak

İç kulak, petröz kemik içinde bulunur. İşitme ve denge organlarını barındırır. Kemik labirent ve zar labirent olmak üzere iki kısımda incelenir. Kemik labirent perilenf, membranöz labirent ise endolenf içermektedir. Kemik labirent üç parçadan oluşur. Bunlar; koklea, vestibül ve kemik semisirküler kanallardır. Membranöz labirent de 3 parçadan oluşur. Bunlar koklea, vestibülde yer alan iki otolit organ (utrikulus, sakkulus) ve arka labirentteki üç semisirküler kanaldır.²

2- RAT KULAK ZARI

Ratlarda kulak zarı sadece pars tensadan oluşur. Pars flaksida yerinde ise kemik bir lamel olan supratimpanik krest bulunur. Renk ve Şekil olarak insan kulak zarı ile benzer özelliklere sahip olup daha ince ve Őeffaftır. Ortalama apı vertikal düzlemde 7 mm, horizontal düzlemde 8 mm'dir. Fibröz anulusu bulunmayan kulak zarı kemik anulusun serbest kenarına sıkıca tutunur.^{23,48}

3- KULAK ZARININ HİSTOLOJİK YAPISI

Kulak zarının pars tensa kısmı üç tabakadan oluşur. Dışta, dış kulak yolu cildinin devamı olan epitel tabakası, ortada fibroblastlar, endotel hücreleri ve sinirleri bulunduran lamina propria (fibröz tabaka), içte ise orta kulak mukozasının silyalı küboid epitel tabakası mevcuttur. Fibröz tabaka dışta radial, içte ise sirküler liflerden yapılmıştır. Radial ve sirküler lifler temel olarak kollajen fibrillerden oluşur. Sirküler lifler periferde ve periferde yakın olan kısımlarda bulunur. Zarın umboya yakın kısımlarında ise yalnızca radial lifler bulunur. Pars tensanın uç kısımlarında fibröz tabaka kalınlaşarak anulus fibrocartilagineus adı verilen halkayı meydana getirir. Pars flaksida da fibröz tabaka olmamasına karşın zengin kapiller ağ ve sinirler bulunur.^{2,62,63}



Şekil 4. Kulak zarının histolojik yapısı.³⁶ Ep: epitel tabakası, FL: fibröz tabaka, E: orta kulak mukozasının epitel tabakası, Cap: kan damarları, CF: kollajen fibriller, RL: dış radial lifler, CL: iç sirküler lifler, EF: elastik fibriller

4- KULAK ZARI PERFORASYONLARINDA İYİLEŞME MEKANİZMASI

Kulak zarı iyileşmesini vücuttaki diğer dokuların iyileşmesinden ayıran iki önemli özellik vardır. Birincisi; dıştaki skuamöz epitelin kulak zarının merkezinden periferik ve dış kulak yoluna doğru devamlı bir migrasyon halinde olması, diğeri ise kulak zarı perforasyonunda rejenerasyon gösteren epitele altta destek görevi gören, reperatif hücrelere ve besinlere geçiş sağlayacak önceden oluşmuş bir matriksin bulunmamasıdır.^{28,29,32}

Kulak zarı perforasyonlarında iyileşme epitelyal migrasyon, fibroblastik aktivitede artış ve vasküler proliferasyon şeklinde olur. Perforasyon oluşumunu takiben fibröz tabakada ödem, epitelde nekroz ve perforasyon kenarlarında eksuda meydana gelir. Oluşan bu eksuda perforasyon kenarlarını koruyarak dehidratasyonu önler. Perforasyonu takiben bir iki gün içinde perfore kulak zarından geri kalan epitel tabakasında perforasyona farklı uzaklıklarda bulunan epitel üretim merkezlerinden skuamöz epitelin aşırı şekilde çoğalması şeklinde proliferasyon gözlenir. Epitel üretim merkezleri genellikle iyi kanlanan bölgeler olup; bunlar malleus boynu, anulus ve dış kulak yolu kanalıdır. Prolifere olan skuamöz epitel perforasyon merkezine doğru migrasyon gösterir. Üçüncü günden sonra fibröz tabakada kapiller tomurcuklanmalar ve fibroblastlar ortaya çıkar. Skuamöz epitelin perforasyonun karşı tarafındaki hücrelerle birleşmesi ile perforasyon büyüklüğüne göre 7–21 günde kapanır.^{18,20,27,39,56}

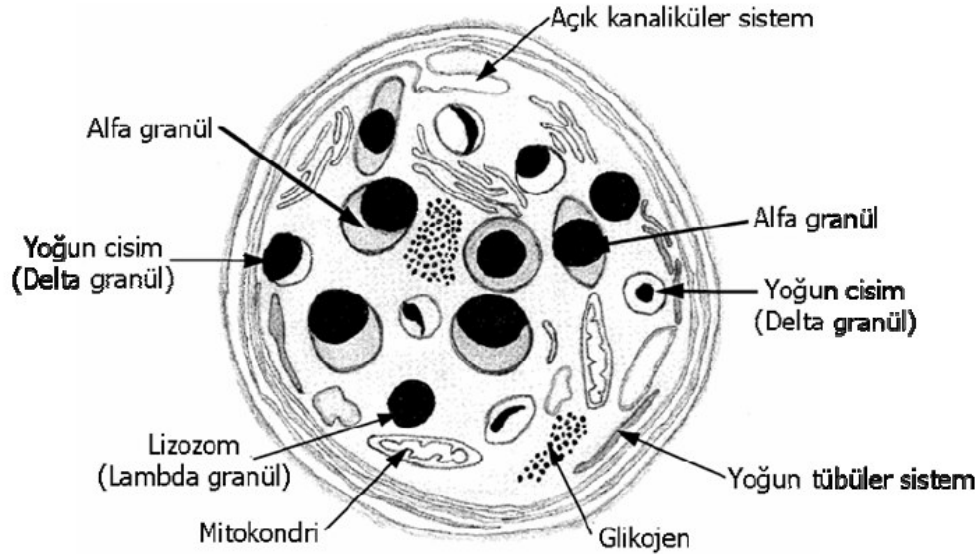
Birçok yara iyileşmesinde, üzerinde re-epitelizasyon olduğu bir platforma yatak gibi davranan granülasyon dokusu oluşur. Kulak zarında ise skuamöz epitel tabakası başlangıçta yara üzerinde bir köprü oluşturur; fibröz komponentin yeniden oluşması ise bunu takip eder.²⁴

Klinik olarak şeffaf, ince bir görüntüye sahip olan yeni zarın sadece skuamöz epitel ve mukoza katından oluştuğu kanısı bulunmasına rağmen ultrastrüktüel incelemede genellikle ince bir fibröz tabakanın bulunduğu da gösterilmiştir.²⁷

5- TROMBOSİTLER VE TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA

A- Trombositlerin Yapısı ve İçerikleri

Trombositler 2–4 μ çapında, disk biçiminde, çekirdek içermeyen sitoplazma parçacıklarıdır. Kemik iliğindeki dev hücreler olan megakaryositler tarafından üretilirler ve periferik kan dolaşımına girdikten sonra yaklaşık 10 gün yaşarlar. Periferik yaymada kümeler halinde gözlenen trombositler tek tek incelendiğinde soluk mavi boyanan ve hyalomer adı verilen şeffaf bir periferik bölge ile mor boyanan ve granüllerin yerleştiği granülomer adı verilen merkezi kısımlardan oluşur. Trombositler, plazma membranının sitoplazma içerisine parmak şeklinde uzantılarından oluşan ve açık kanaliküler sistem adı verilen bir kanal sistemine sahiptirler. Bu sistem sitoplazmada bulunan aktif moleküllerin dış ortama atılmasını sağlayan fonksiyonel bir yapıdır. Hyalomer bölgesi içerisinde yoğun tübüler sistem adı verilen ikinci bir kanalikül sistemi daha bulunmaktadır. Bu kanalikül sistemi, primer olarak trombosit aktivasyonu için gerekli olan kalsiyum iyonlarını depolar.^{8,12,30,54}



Şekil 5. Trombositlerin yapısı⁵⁴

Trombositlerde elektron mikroskopik incelemeler ile birbirlerinden ayırt edilebilen başlıca üç tip granül bulunmaktadır. Alfa, delta ve lambda granüller olarak adlandırılan bu granüllerden ışık mikroskobu ile görülebilen granüllerin büyük çoğunluğu alfa granüllerdir. Değişik boyut ve içeriklere sahip olan bu granüllerin işlevleri de birbirlerinden farklıdır.^{12,51,54}

Tablo 1. Trombosit granüllerinin içerikleri

Delta granül	Alfa granül	Lambda granül
Nükleotidler <ul style="list-style-type: none"> ➤ ATP, ADP ➤ GTP, GDP 	Yapışkan glikoproteinler <ul style="list-style-type: none"> ➤ Fibronektin, Vitronektin ➤ Von Willebrand Faktör ➤ Trombospondin 	Asid proteazlar <ul style="list-style-type: none"> ➤ Katepsin D, E ➤ Karboksipeptidazlar ➤ Kollajenaz ➤ Asit fosfataz ➤ Arilsülfataz
Aminler <ul style="list-style-type: none"> ➤ Serotonin ➤ Histamin 	Hemostaz faktörleri <ul style="list-style-type: none"> ➤ Fibrinojen, Faktör V, VII, XI, XIII, Protein S, Fibrinojen 	Glikohidrolazlar <ul style="list-style-type: none"> ➤ Heparinaz ➤ Diğerleri
Çift değerlikli katyonlar <ul style="list-style-type: none"> ➤ Kalsiyum ➤ Magnezyum 	Hüresel mitojenler <ul style="list-style-type: none"> ➤ PDGF, TGF-β, EGF, VEGF, IGF 	
	Proteoglikanlar	
	Proteaz inhibitörleri	
	Albümin ve immünglobulinler	

Alfa granüller: 200–400 nm çapında olan bu granüller diğerlerine oranla çok daha heterojen bir içeriğe sahiptirler. Boyut ve sayıları nedeni ile trombositlerin majör granülleri olarak kabul edilirler. Küresel veya oval şekilli olan bu granüllerin içinde koyu renkli görünen alanlarda proteoglikanlar yer alırken, daha açık renkli periferel zonda von Willebrand faktör gibi plazma proteinleri ve tübüler yapılar yer almaktadır. Alfa granüllerin hemostaz, inflamasyon, kemik ve yara iyileşmesinde görevli pek çok protein ve büyüme faktörü içermesi, trombositlerin yoğunlaştırılarak klinikte yara ve kemik iyileşmesi gibi alanlarda kullanımının gündeme gelmesine neden olmuştur.^{12,22,51}

Delta granüller: Ortalama 150 nm çapa sahip olan bu granüller elektron mikroskopta ışınları yoğun olarak absorbe etmeleri nedeni ile dens görülmektedirler. Bu nedenle delta granüller yoğun cisimler olarak da adlandırılırlar. Kalsiyum iyonları, pirofosfat, ADP ve ATP gibi protein olmayan molekülleri içeren granüllerdir.^{51,54}

Lambda granüller: Sadece lizozomal enzimler içeren bu granüllerin çapları 175–250 nm arasında değişmektedir. Bu enzimler, bakterisidal etkileri yanında plazminin tamir fazından sonra bölgedeki pıhtıyı eriterek ortadan kaldırılması sürecinde de görev alan enzimlerdir.^{51,54}

B- Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri kan ürünleri ve lokal dokulardan salgılanan, yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu ve normal vücut gelişimini kontrol eden proteinlerdir. Spesifik hedef hücreleri çoğalmaya veya göç etmeye aktive ederler.²⁵

Büyüme faktörleri epitelizasyon, anjiogenez ve kollajen metabolizmasını etkileyen hücrelerin proliferasyonu ve migrasyonunu kontrol ederek yara iyileşmesine katkıda bulunurlar. Dolaşımda bulunan trombositlerin α -granülleri içinde platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β), insulin-like growth factor (IGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) ve epidermal growth factor (EGF) bulunur. Vücutta ayrıca keratinosit growth factor (KGF) ve fibroblast growth factor (FGF) gibi büyüme faktörleri de bulunmaktadır.^{12,39}

Platelet-Derived Growth Factor: Trombositlerdeki alfa granüllerden, endotelial hücrelerden, fibroblastlardan, düz kas hücrelerinden ve makrofajlardan sentezlenir. Fibronektin ve hyaluronik asit gibi yaranın yeniden şekil almasında kritik önem taşıyan ekstrasellüler matriks üyelerinin üretimini arttırarak ve fibroblastları mitojenik olarak etkileyerek yara iyileşmesini hızlandırır.^{26,39,63}

Transforming Growth Faktör- β : Vücuttaki tüm hücreler tarafından sentezlenebilen ve yine tüm hücrelerce duyarlı olunan bir faktördür. TGF- β , yara iyileşmesi aşamalarında, trombositlerden başka lenfositler, makrofajlar, endotelial hücreler, düz kas hücreleri, epitelial hücreler ve fibroblastlardan da salgılanmaktadır.

Yara yerinde kemotaktik ve anjiogenezi hızlandırıcı etkisi vardır. Ayrıca kollajen, fibronektin ve glikozaminoglikanlar gibi birçok matriks proteininin sentezini regüle eder.^{6,26}

Insulin-like Growth Factor: Keratinosit, osteoblast, fibroblast ve trombosit gibi değişik hücreler tarafından üretilebilir. Hücre kültürleri üzerinde yapılan deneysel çalışmalar IGF'in fibroblastlar, keratinositler, osteoblastlar, epitelyal hücreler gibi pek çok hücre üzerinde mitojenik olduğunu göstermektedir.²⁶

Vascular Endothelial Growth Factor: İlk olarak tümör hücreleri tarafından sentez edildiğinin bulunmasına rağmen nötrofiller, trombositler, keratinositler gibi birçok hücre tipi tarafından da salgılandığı gösterilmiştir. VEGF, yara iyileşmesinde önemli rol oynayan fibroblast ve endotelyal hücrelerin proliferasyonunda ve bu hücrelerin göçünün uyarılmasında görevlidir. Ayrıca vasküler geçirgenliği arttırarak da yara iyileşmesine katkıda bulunur.²⁶

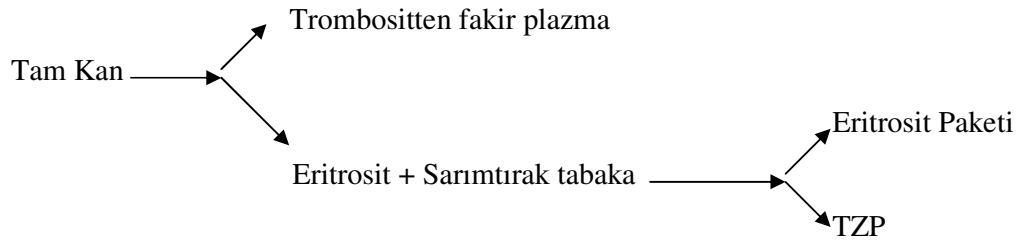
Epidermal Growth Factor: Epitelyal hücreler için kemotaktiktir ve fibroblastlarda glikozaminoglikanların sentezini arttırabilir. EGF epitelyal ve endotelyal hücrelerin, fibroblastların ve keratinositlerin proliferasyonuna neden olabilir. I125 ile yapılan bir çalışmada kulak zarında EGF için yüksek affinitesi olan reseptörler gösterilmiştir.⁴⁵ Yapılan çalışmalarda immunohistokimyasal lokalizasyon kullanılarak perfore ve perfore olmayan kulak zarlarında EGF reseptörlerinin yerleşimi gösterilmiştir.^{39,45,56}

Fibroblast Growth Factor: Fibroblast, kondrosit, endotel hücresi, osteoblast ve keratinositler üzerinde mitozu arttırıcı etki gösterir ve anjiogenez ile endotelyal hücre göçünde rol oynar. FGF, anjiogenezin başlaması için gerekli olan kollajenaz üretimini ve kapiller endotel hücrelerinin proliferasyonunu sağlar. FGF ailesi içinde asidik FGF ve bazik FGF (bFGF) bulunur.^{26,39}

C- Trombositten Zengin Plazma (TZP)

Yüksek konsantrasyonda trombosit içeren küçük bir plazma volümü trombositten zengin plazma (TZP) olarak adlandırılır. TZP hazırlanmasındaki temel amaç, büyüme faktörleri içeren trombositlerin konsantrasyonunun artırılmasıdır. TZP içinde biyolojik olarak oranları belirlenmiş, doğal büyüme faktörleri bulunur. Bu, TZP’i rekombinant büyüme faktörlerinden ayıran özelliktir. Rekombinant büyüme faktörleri saf insan büyüme faktörleridir, ancak doğal büyüme faktörü değildirler. Çoğunlukla çekirdeğine bir bakteriyel plazmid vektör yoluyla insan geni eklenmiş hamsterin over hücre kültürlerinde sentezlenirler.^{8,40}

TZP elde etmenin temel yöntemi santrifüj işlemidir. Hastadan alınan kan, antikoagülan solüsyon içine alındıktan sonra seri santrifüj işlemlerinden geçirilir. Santrifüj işleminin ilk basamağı 5600 rpm’de yapılır ve bu yüksek devirli döndürüş adını alır. Bu döndürüş ile trombositten fakir plazma, eritrositleri ve trombositleri içeren sarımtırak katmandan ayrılır. Santrifüj işleminin ikinci basamağı düşük devirli döndürüş adını alan 2400 rpm’de yapılır. Bu döndürüş eritrositleri ortamdan ayırır ve TZP elde edilir. Kandaki normal trombosit sayısı 150.000 – 350.000/ μ l kadardır. Santrifüj işlemleri sonucunda trombosit sayısı kandaki normal değer 3–8 katına kadar çıkarılabilir. TZP’de trombosit sayısı ise ortalama 1.000.000/ μ l kadardır. Yapılan çalışmalarla TZP’nin doku iyileşmesi sağlayabilmesi için gerekli trombosit konsantrasyonunun 1.000.000/ μ l olması gerektiği konusunda fikir birliği sağlanmıştır.^{12,41,59,61}



TZP elde edildikten sonra 8 saat antikoagüle halde stabil kalabilir. Elde edilen TZP’i aktive etmek için ortama kalsiyum ilavesi yapmak gerekir. Ortama kalsiyum ilave edilmesi ile TZP pıhtılaşarak jel halini alır.^{12,15,59}

Pıhtılaşma trombositleri aktif hale getirerek büyüme faktörlerinin hızla salgılanmasını sağlar. Oluşan pıhtı içerisindeki aktive trombositler, alfa granülleri içerisinde bulunan çok sayıda büyüme faktörünü ortama saldıklarında, bu faktörler uygulama sahası içerisinde büyüme faktörlerinden zengin bir mikroçevrenin oluşmasını sağlar. Trombositler aktive olduktan sonra 10 dakika içinde depoladıkları büyüme faktörlerinin % 70'i, birinci saat sonunda ise % 100'ü ortama salgılanır.^{8,12,40}

TZP, fibrin yapıştırıcı değildir. TZP'de trombosit konsantrasyonu fibrin yapıştırıcıya göre daha fazladır. Ayrıca TZP'deki fibrinojen konsantrasyonu fibrin yapıştırıcıya oranla daha azdır. Daha az fibrinojen içerdiği için uygulandığı ortamda çok katı bir fibrin oluşmaz, bu nedenle yara iyileşmesini engellemeyip, aksine içindeki büyüme faktörleri sayesinde bu olayı hızlandırdığı düşünülmektedir. TZP'nin içindeki doğal fibrinojen konsantrasyonu TZP'nin cerrahi alana uygulanmasını kolaylaştıran jelatinöz, yapışkan kıvamını verir.⁶¹

Kullanım Alanları

TZP'nin ilk olarak kemik rejenerasyonu üzerindeki olumlu etkilerinin tespit edilmesi, öncelikle maksillofasial ve diş cerrahisi alanında kullanıma girmesine neden olmuştur. Bunun dışında oftalmolojide maküla ve retina yaralanmalarında, ortopedik spinal füzyon ameliyatlarında, rekonstrüktif cerrahide kronik ülser ve iyileşmeyen yaraların tedavisinde kullanılmıştır.^{4,7,12,16,41}

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma 01.04.2007–01.08.2007 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nca Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinde etik kurul izni alınarak, Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nın katkıları ile yapılmıştır.

Çalışmada dış kulak yolu ve kulak zarları sağlam, ağırlıkları 250–300 gram arasında değişen toplam 44 adet Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı. Ratlar ışık alan bir odada, 25 °C sıcaklıkta, serbest yemek ve su alabildikleri bir ortamda barındırıldı. Tüm ratlara kulak zarlarında perforasyon oluşturulmasını takiben enfeksiyon profilaksisi için 5 gün süreyle 150 mg/ kg/ IM ampisilin uygulandı.

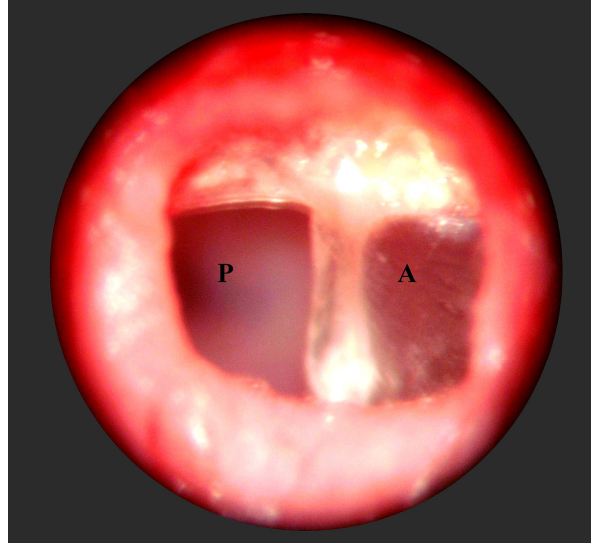
Anestezi ketamin hidroklorür 50 mg/ kg ve xylacine 10 mg/ kg/ IM ile sağlandı. Trombositten zengin plazma hazırlamak için her bir rattan kendilerinde kullanılmak üzere kalpten alınan 2 ml kan EDTA'lı tüp içine kondu. Tüpler 5600 rpm'de santrifüj işlemine tabi tutuldu ve işlem sonucunda kan trombositten fakir plazma, eritrositler ve trombositleri içeren sarımtırak kısım olmak üzere üç katmana ayrıldı. Trombositten fakir plazma kısmı atılarak geri kalan kısma tekrar 2400 rpm'de santrifüj işlemi yapıldı. Bu işlem sonunda eritrositler de ayrılarak trombositten zengin plazma elde edildi.

Trombositten zengin plazma hazırlanmasını takiben tüm deneklerin kulak zarlarına cerrahi mikroskop altında spekulum yardımıyla bakıldı (Resim 1).



Resim 1. Rat normal kulak zarı

Ratların sağ kulak zarları çalışma, sol kulak zarları ise kontrol grubu olarak belirlendi. Rat kulak zarlarının pars tensa kısımlarının posterior kadranında özel olarak hazırlanmış 3mm çaplı pik yardımıyla perforasyon oluşturuldu (Resim 2).

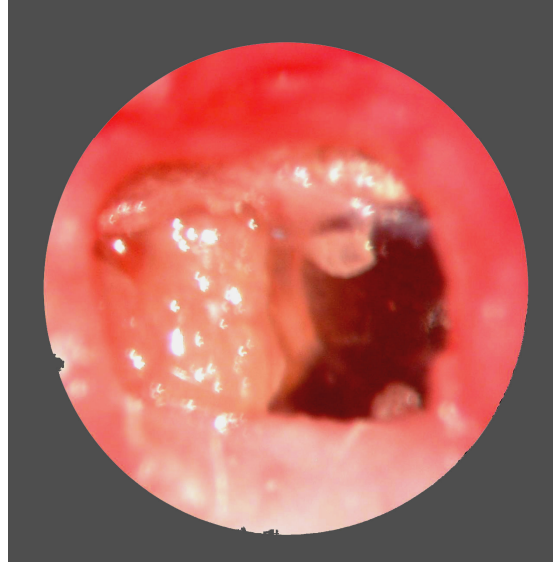


Resim 2. Kulak zarı posterior kısımda oluşturulan perforasyon. P: Posterior A: Anterior

Hazırlanan TZP'i aktive etmek amacı ile 1/10 oranında Ca (Ca Sandoz %10, Novartis) ile karıştırıldı ve yapışkan jel formu elde edildi (Resim 3). Çalışma grubu olarak alınan sağ kulak zarlarında oluşturulan perfore bölgeye, ratların kendilerinden alınan 2 ml kanla hazırlanan trombositten zengin plazma bir pik yardımı ile yerleştirildi (Resim 4). Kontrol grubu olan sol kulak zarları ise spontan iyileşmeye bırakıldı.



Resim 3. Jel formunda trombositten zengin plazma



Resim 4. Perfore bölgeye trombositten zengin plazma uygulanması

Kulak zarı iyileşmesini klinik ve histopatolojik olarak inceleyebilmek amacı ile ratlar iki gruba ayrıldı. Birinci gruptaki 20 ratın kulak zarı perforasyonu kapanma süreleri bir ay boyunca günlük otomikroskopik muayene ile takip edildi ve kapanma süreleri kaydedildi. İkinci grupta yer alan 24 rat ise kulak zarı perforasyonlarının kapanma süresinden bağımsız olarak, her grupta 6 rat olacak şekilde 4 gruba ayrıldı ve histopatolojik inceleme amacı ile 3., 7., 14. ve 28. günlerde sakrifiye edildi.

Histopatolojik değerlendirme Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Histopatolojik inceleme için ratların timpanik bullaları çıkartıldı ve %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda 24 saat süre ile tespit edildi. Ardından doku örnekleri formik asit-sodyum sitrat solüsyonunda 7-10 gün bekletilerek dekalsifiye edildi. Timpanik bullalar malleusun kısa kolundan geçecek şekilde kulak zarına transversal bir kesit uygulanarak ikiye bölündü. Beş μ kalınlığında kesitler alınıp Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskopu (Olympus BX-50, Olympus Optical, Japan) kullanılarak x40 objektif büyütmeyle değerlendirildi. Yapılan incelemede kulak zarları; **lamina propriada ödem, neovaskülarizasyon, fibroblastik aktivite ve inflamatuvar hücre varlığı** yönünden değişiklikler -/+ /++ /+++ olarak değerlendirildi. Ayrıca kulak zarı kalınlığı mikroskopla ölçülüp μ cinsinden hesaplandı. Çalışma ve kontrol grubundaki inceleme sonuçları istatistiksel olarak Student t testi ve Mann-Whitney testi ile karşılaştırıldı.

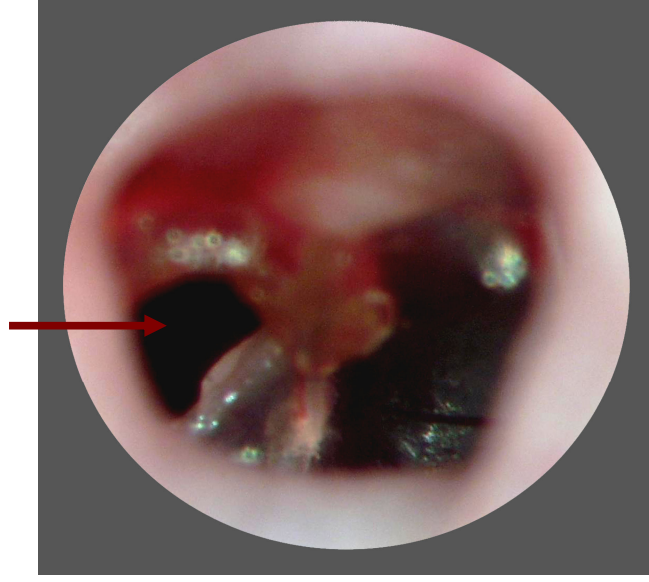
BULGULAR

Yirmi ratın çalışma ve kontrol kulak zarları, perforasyonun kapanma süresini tespit etmek amacı ile bir ay boyunca günlük otomikroskopik muayene ile takip edildi. Perforasyon kapanma süreleri tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. TZP uygulanan çalışma ve kontrol grubu kulak zarlarındaki perforasyonların kapanma süreleri

Rat No	KAPANMA SÜRESİ (GÜN)	
	Çalışma grubu	Kontrol grubu
1	12	17
2	10	8
3	9	10
4	8	15
5	7	9
6	13	11
7	10	12
8	12	15
9	8	11
10	10	12
11	7	9
12	13	16
13	14	17
14	9	12
15	13	16
16	9	14
17	9	16
18	8	13
19	12	10
20	11	17
ORTALAMA	10.2 ± 2.1	13.0 ± 2.9

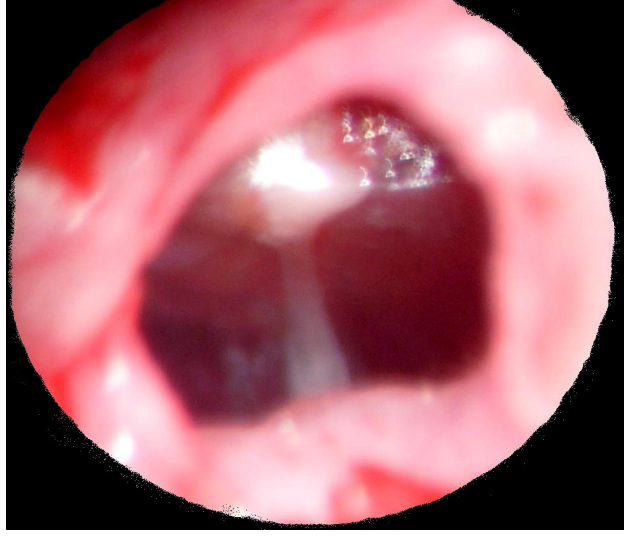
Çalışma grubu olan sağ kulak zarlarında perforasyon kapanma süresi ortalama 10.2 ± 2.1 gün iken, kontrol grubunda 13.0 ± 2.9 gün olarak bulundu. Perforasyon kapanma süresi açısından çalışma ve kontrol kulak zarları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p < 0.05$). Hiçbir ratta kalıcı perforasyona rastlanılmadı.



Resim 5. Yedinci gün TZP uygulanmış kulak zarı. Zar henüz iyileşmemiş.



Resim 6. Onuncu gün TZP uygulanmış kulak zarı. Zar iyileşmiş.



Resim 7. Yirmisekizinci gün TZP uygulanmış kulak zarı. Zar iyileşmiş.

Histopatolojik inceleme için ayrılan 24 rat, kulak zarlarındaki perforasyonun kapanıp kapanmamasına bakılmaksızın rastgele 3., 7., 14. ve 28. günlerde sakrifiye edildi. Tablo 3, 4, 5, 6, 7 ve 8'de sakrifiye edilen ratların çalışma ve kontrol kulak zarlarındaki histopatolojik inceleme sonuçları verilmiştir.

Tablo 3. Üçüncü gün histopatolojik inceleme sonuçları

	Çalışma Grubu (n=6)		Kontrol Grubu (n=6)		p
	n	%	n	%	
L. propria ödemi					
-	1	16.6	1	16.6	
+	4	66.6	2	33.3	
++	-	-	2	33.3	
+++	1	16.6	1	16.6	
					0.492
Neovaskularizasyon					
-	5	83.3	6	100.0	
+	1	16.6	-	-	
++	-	-	-	-	
+++	-	-	-	-	
					0.317
Fibroblastik aktivite					
-	3	50.0	5	83.3	
+	2	33.3	1	16.6	
++	1	16.6	-	-	
+++	-	-	-	-	
					0.209
İnflamatuar hücre varlığı					
-	3	50.0	3	50.0	
+	2	33.3	2	33.3	
++	1	16.6	1	16.6	
+++	-	-	-	-	
					1.00

Üçüncü gün sakrifiye edilen ratlarda çalışma ve kontrol grupları arasında lamina propria ödemi, inflamatuvar hücre varlığı, neovaskularizasyon ve fibroblastik aktivite pozitiflikleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0.05$) (Tablo 3).

Tablo 4. Yedinci gün histopatolojik inceleme sonuçları

	Çalışma Grubu (n=6)		Kontrol Grubu (n=6)		p
	n	%	n	%	
L. propria ödemi					
-	2	33.3	1	16.6	
+	1	16.6	4	66.6	
++	3	50.0	1	16.6	
+++	-	-	-	-	
					0.670
Neovaskülarizasyon					
-	2	33.3	5	83.3	
+	2	33.3	1	16.6	
++	2	33.3	-	-	
+++	-	-	-	-	
					0.049
Fibroblastik aktivite					
-	2	33.3	3	50.0	
+	2	33.3	2	33.3	
++	1	16.6	1	16.6	
+++	1	16.6	-	-	
					0.445
İnflamatuvar hücre varlığı					
-	2	33.3	2	33.3	
+	3	50.0	3	50.0	
++	-	-	1	16.6	
+++	1	16.6	-	-	
					0.930

Yedinci gün sakrifiye edilen ratlarda çalışma ve kontrol grupları arasında lamina propria ödemi, inflamatuvar hücre varlığı ve fibroblastik aktivite bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0.05$). Çalışma grubunda neovaskülarizasyonun kontrol grubuna göre daha fazla olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p<0.05$) (Tablo 4).

Tablo 5. Ondördüncü gün histopatolojik inceleme sonuçları

	Çalışma Grubu (n=6)		Kontrol Grubu (n=6)		p
	n	%	n	%	
L. propria ödemi					
-	3	50.0	2	33.3	
+	1	16.6	3	50.0	
++	2	33.3	-	-	
+++	-	-	1	16.6	
					0.799
Neovaskülarizasyon					
-	2	33.3	4	66.6	
+	4	66.6	1	16.6	
++	-	-	1	16.6	
+++	-	-	-	-	
					0.476
Fibroblastik aktivite					
-	1	16.6	2	33.3	
+	4	66.6	3	50.0	
++	1	16.6	1	16.6	
+++	-	-	-	-	
					0.652
İnflamatuar hücre varlığı					
-	3	50.0	3	50.0	
+	2	33.3	2	33.3	
++	-	-	1	16.6	
+++	1	16.6	-	-	
					0.930

Ondördüncü gün sakrifiye edilen ratlarda çalışma ve kontrol grupları arasında lamina propria ödemi, neovaskülarizasyon, inflamatuvar hücre varlığı ve fibroblastik aktivite bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen, neovaskülarizasyon çalışma grubunda 4 ratta gözlenirken, kontrol grubunda 2 ratta gözlemlendi (Tablo 5).

Tablo 6. Yirmisekizinci gün histopatolojik inceleme sonuçları

	Çalışma Grubu (n=6)		Kontrol Grubu (n=6)		p
	n	%	n	%	
L. propria ödemi					
-	4	66.6	5	83.3	
+	2	33.3	-	-	
++	-	-	1	16.6	
+++	-	-	-	-	
					0.673
Neovaskülarizasyon					
-	6	100.0	6	100.0	
+	-	-	-	-	
++	-	-	-	-	
+++	-	-	-	-	
					1.00
Fibroblastik aktivite					
-	-	-	2	33.3	
+	4	66.6	3	50.0	
++	1	16.6	1	16.6	
+++	1	16.6	-	-	
					0.179
İnflamatuar hücre varlığı					
-	6	100.0	6	100.0	
+	-	-	-	-	
++	-	-	-	-	
+++	-	-	-	-	
					1.00

Yirmisekizinci gün sakrifiye edilen ratlarda çalışma ve kontrol grupları arasında lamina propria ödemi, inflamatuvar hücre varlığı, neovaskülarizasyon ve fibroblastik aktivite bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0.05$) (Tablo 6).

Tablo 7. Tüm çalışma ve kontrol gruplarının histopatolojik inceleme sonuçları

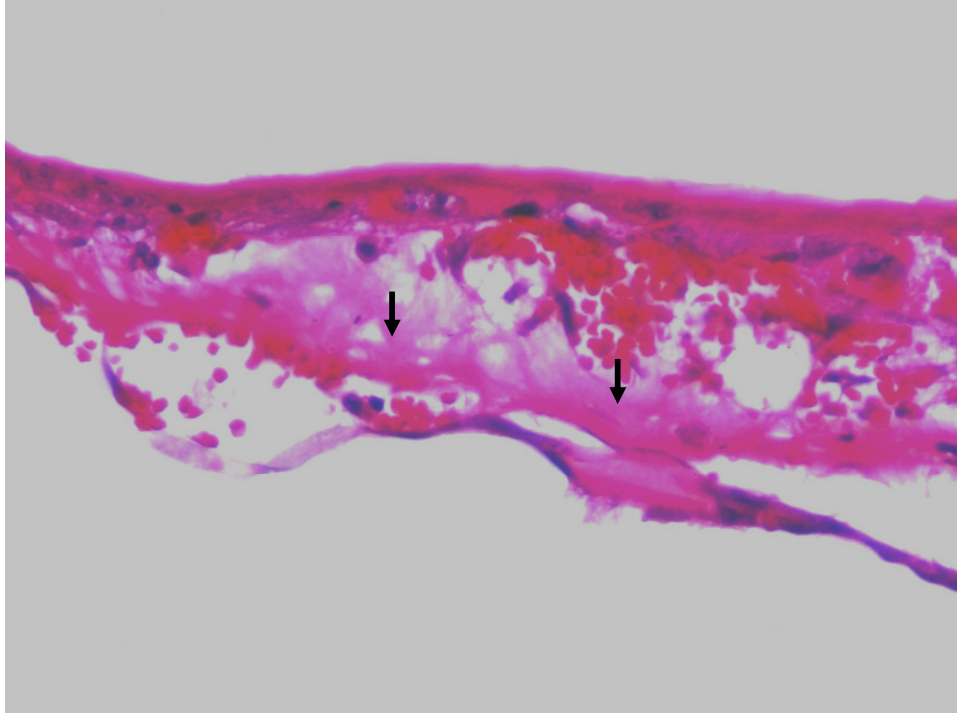
	Çalışma Grubu (n=24)		Kontrol Grubu (n=24)		p
	n	%	n	%	
L. propria ödemi					
-	10	41.6	9	37.5	
+	8	33.3	9	37.5	
++	5	20.8	4	16.6	
+++	1	4.1	2	8.3	
					0.793
Neovaskülarizasyon					
-	15	62.5	21	87.5	
+	7	29.1	2	8.3	
++	2	8.3	1	4.1	
+++	-	-	-	-	
					0.029
Fibroblastik aktivite					
-	6	25.0	12	50.0	
+	12	50.0	9	37.5	
++	4	16.6	3	12.5	
+++	2	8.3	-	-	
					0.042
İnflamatuar hücre varlığı					
-	14	58.3	14	58.3	
+	7	29.1	7	29.1	
++	1	4.1	3	12.5	
+++	2	8.3	-	-	
					0.944

Fibroblastik aktivite ve neovaskülarizasyon tüm ratlarda günlere bağlı olmaksızın çalışma grubunda anlamlı derecede daha fazlaydı ($p<0.05$). Çalışma ve kontrol grupları arasında lamina propria ödemi ve inflamatuvar hücre pozitiflikleri bakımından ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 7).

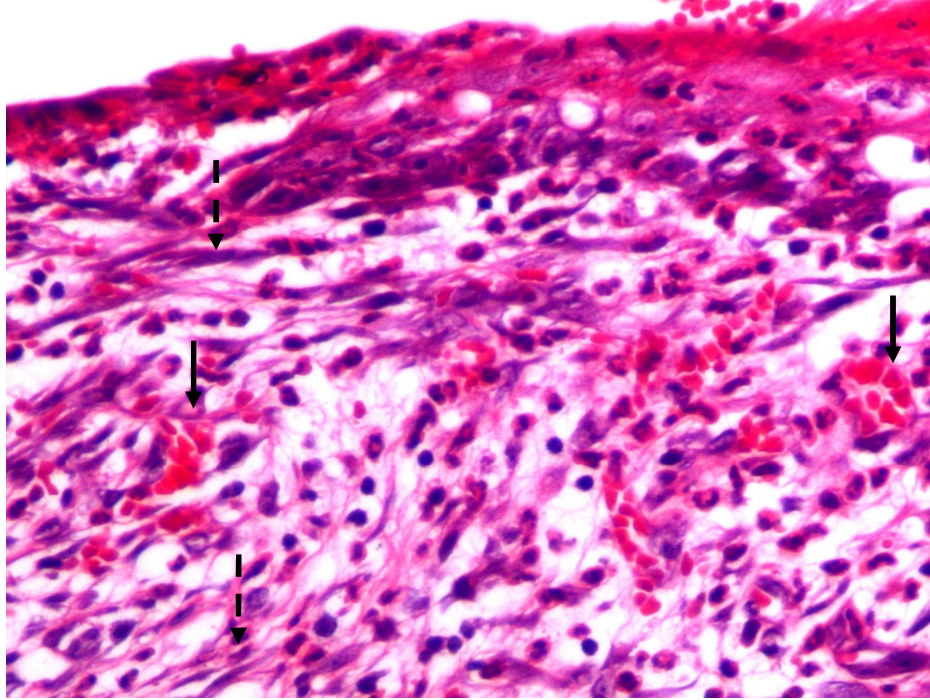
Tablo 8. Kulak zarı kalınlığı. Yirmisekizinci gün.

Çalışma Grubu (μ)	Kontrol Grubu (μ)	p
9.30	8.40	0.763

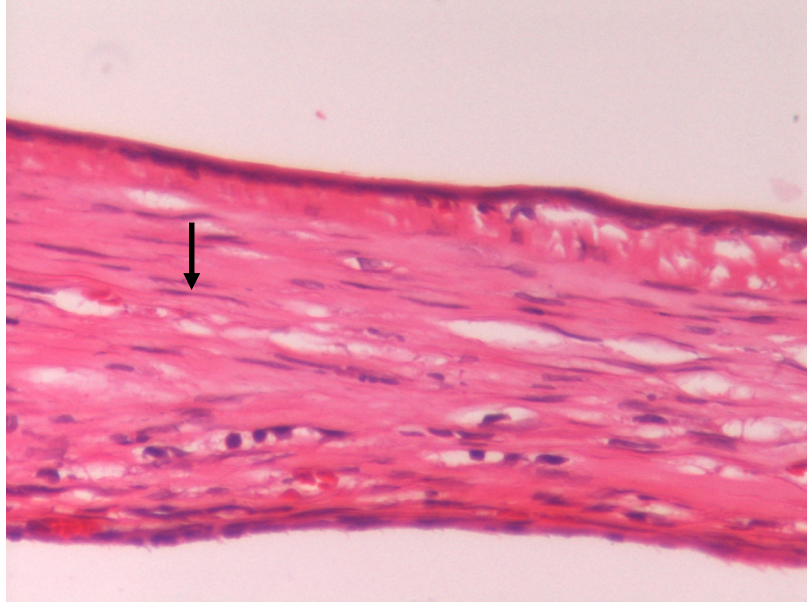
Kulak zarı kalınlıkları açısından incelendiğinde çalışma ve kontrol kulak zarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 8).



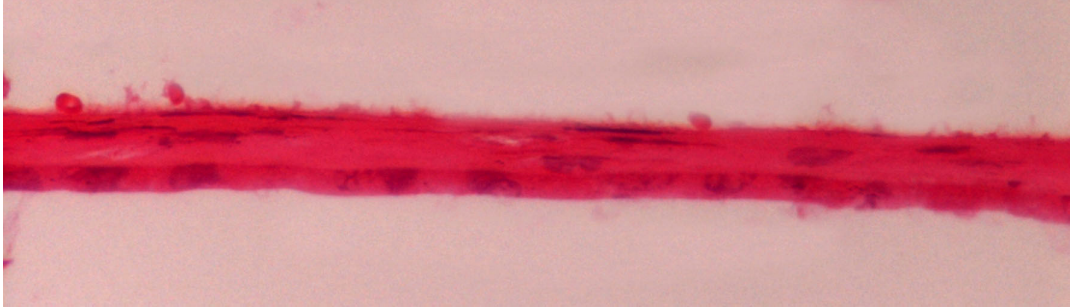
Resim 8. Çalışma grubunda 3. günde sakrifiye edilen rat kulak zarı. Ok: Lamina propria ödemi. HE, x40 objektif büyütme.



Resim 9. Çalışma grubunda 7. günde sakrifiye edilen rat kulak zarı. Neovaskülarizasyon (ok) ve fibroblastik aktivitenin (kesik ok) belirgin olduğu görülmektedir. HE, x40 objektif büyütme.



Resim 10. Çalışma grubunda 14. günde sakrifiye edilen rat kulak zarı. Fibroblastik aktivitenin belirgin olduğu görülmektedir. HE, x40 objektif büyütme.



Resim 11. Çalışma grubunda 28. günde sakrifiye edilen rat kulak zarı. Histopatolojik değişikliklerin kaybolarak normal kulak zarı yapısının şekillendiği görülmektedir. HE, x40 objektif büyütme.

TARTIŞMA

Kulak zarı perforasyonları dış kulak yolu ve orta kulak boşluğunu ilgilendiren tümör, travma ve enfeksiyon gibi çeşitli hastalıklar sonucu ortaya çıkan sık görülen bir bulgudur. Perforasyon yapan nedenlerin başında kulak zarı ve orta kulak boşluğunu ilgilendiren akut ve kronik otitis media ile daha seyrek olarak tüberküloz ve sifiliz gibi sistemik enfeksiyon hastalıkları gelir.^{39,42,56,58}

Akut otitis media çocukluk çağıının en sık görülen hastalıklarından biridir. Az gelişmiş ülkelerde ve özellikle sosyoekonomik seviyesi düşük ailelerin çocuklarında daha sık görülür. Tüm çocukların % 85'i 5 yaşına kadar en az bir kez akut otitis media atağı geçirir. Akut otitlerin % 95'i kendiliğinden düzelmesine rağmen, %5'i kronik safhaya geçmekte ve oluşan kulak zarı perforasyonları kalıcı hale gelebilmektedir.^{2,21,55}

Travma, zar perforasyonu yapan nedenler arasında enfeksiyonlardan sonra ikinci sıklıkta kendini gösterir. Temporal kemik travmaları içerisinde uzunlamasına olan kırıklarla, kulağı ilgilendiren delici ve batıcı travmalar da kulak zarında perforasyona neden olabilir. Çocukluk yaş grubunda sık olarak karşılaşılan effüzyonlu otitis media ile baş boyun bölgesi kanserleri ve özellikle de nazofarenks kanseri tedavisinde uygulanan radyoterapi sonrasında ortaya çıkan effüzyonun tedavisinde uygulanan miringotomi ve ventilasyon tüpü tatbiki işlemlerinden sonra, ventilasyon tüpünün tipine ve zarda kalış süresine göre iatrojenik olarak %2.1 ile %14.5 arasında değişen oranlarda kalıcı perforasyon oluşabilmektedir.^{9,49,60}

Kulak zarı perforasyonları enfeksiyon veya travmanın şiddetine göre küçük bir perforasyondan zarın tamamını ilgilendiren total perforasyonlara kadar ulaşabilmekte, lokalizasyon olarak da çeşitli kadranları tutabilmektedir. Kapanmayan kalıcı zar perforasyonları sonrası dış ortama açık hale gelen orta kulak boşluğunda tekrarlayan enfeksiyonlar hem orta kulak yapılarını etkileyerek iletim ve mikst işitme kaybı, hem de yuvarlak ve oval pencere yoluyla iç kulağa geçerek kalıcı sensörinöral işitme kayıplarına neden olabilmektedir. Özellikle çocukluk yaş grubunda perforasyona bağlı ortaya çıkan işitme kaybı çocukların okuldaki başarısını önemli oranda düşürmekte ve sosyal gelişimini geciktirmektedir. Perforasyonların kalıcı hale gelmesinde enfeksiyonun şiddeti, predispozan faktörlerin devam etmesi, hastanın direnci, yetersiz antibiyotik kullanımı, beslenme gibi çeşitli faktörler rol oynamaktadır.^{1,2,31,35,63}

Kulak zarı perforasyonlarının tedavisinin önemi bilinmektedir. Çeşitli nedenlerle ortaya çıkan perforasyonların kısa sürede kapatılması, enfeksiyon riskinin azaltılması dışında kişinin kısa sürede normal alışkanlıklarına dönmesini de sağlayacaktır. Aksi halde enfeksiyona maruz kalarak iyileşme süreci uzayacak ve kişi yüzme gibi sosyal aktivitelerinde ve banyo esnasında kulağını sürekli olarak sudan korumak zorunda kalacaktır. Yaşlı popülasyonda ve sistemik hastalığı olan kişilerde perforasyonun cerrahi olarak kapatılması, genel anestezi riski ve cerrahi morbidite gibi nedenlerle pek tercih edilmemektedir. Ancak yaşla birlikte artan işitme kayıpları yanında işitme cihazlarındaki büyük gelişmeler kişilerin yeniden duyma ile ilgili büyük istekleri olduğunu göstermektedir. Bu kişilerde lokal şartlar altında uygulanacak tedavi metodları ile kapatılan kulak zarları sonrasında güçlü hava yolu işitme cihazları kullanmasına ve bunun sonucunda çevresiyle daha rahat iletişim kuran bir birey olmasına neden olabilecektir.

Kulak zarı perforasyonu yapan nedenlerin medikal tedavisi sonrasında kapanmayan kalıcı perforasyonların cerrahi tedavisi 1950'li yıllarda başlayan miringoplasti ve timpanoplasti ameliyatlarıyla önemli bir mesafe kaydetmiştir. O zamandan beri perforasyonları kapatmak için çeşitli materyaller kullanılmış ve başarıları, kapanma süreleri değerlendirilmiştir. Perforasyon kapatılmasında en sık kullanılan materyal temporal adele fasyasıdır. Bunun haricinde ven grefti, otolog yağ ve kıkırdak greftleri de kullanılmaktadır. Cerrahi ile perforasyonun kapanması olguların %88–95'inde başarılı bulunmuştur. Ancak yüksek maliyet, morbidite ve teknik olanakların yetersizliği cerrahinin olumsuzlukları olarak gösterilmektedir. Bu nedenle kulak zarı perforasyonlarının tedavisinde ucuz, daha az invaziv ve uygulanması kolay metotlara ihtiyaç vardır. Uzun yıllardır kulak zarı perforasyonları ve perforasyonlarda uygulanacak tedavi yöntemleri araştırılmaktadır.^{20,37,63}

Kulak zarı perforasyonunda iyileşme epitelyal migrasyon, fibroblastik aktivitede artış, vasküler proliferasyon ve dokunun yeniden şekillenmesini içeren kompleks bir olaydır. Kulak zarında yara iyileşmesi, vasküler dağılıma bağlı olarak başlangıçtaki hemostatik ve enflamatuvar evreler sıradan olmasına rağmen proliferasyon ve migrasyon evrelerinde diğer dokulardan tamamen farklıdır. Birçok yara iyileşmesinde, üzerinde re-epitelizasyon olduğu bir platforma yatak gibi davranan granülasyon dokusu oluşur. Kulak zarında ise skuamöz epitel tabakası başlangıçta yara üzerinde bir köprü

oluştururken fibröz komponentin yeniden oluşması bunu takip eder. Oluşan yeni kulak zarının incilmesi özellikle fibröz tabakanın yeniden şekillenmesiyle olur. Kulak zarında oluşan perforasyonlar spontan olarak kapanabileceği gibi bazı durumlarda kapanmaz veya sadece ince bir membranla kapanabilir. İnsanda oluşan bu yeni membranla ilgili histolojik çalışmalarda fibroblastlardan yoksun ve lifleri belli bir yöne yönelmemiş atrofik bir lamina proprianın varlığı gösterilmiştir. Önemli olan nokta iyileşmekte olan kulak zarında normal bir zar kalınlığına benzer kalınlığın elde edilmesidir.^{18,20,24,27,39,56}

Kulak zarı perforasyonu kapanmasını hızlandırmak için araştırmalar iki farklı yola yönelmiştir. Bunlardan birisi perforasyon kenarlarında rejenerasyon olan dokuya yol göstermek için stromal destek sağlamaktır. Kağıtla yama yöntemi buna örnek bir uygulamadır ve küçük, enfekte olmayan perforasyonlarda uygun bir metoddur. Perforasyon kenarının mekanik olarak debridmanı veya triklor asetik asit, gümüş nitratla koterizasyonu uzun yıllardır kullanılmaktadır. Ancak bundaki başarı da kısıtlıdır. Kulak zarı perforasyonlarının kapanmasını hızlandırmak için araştırılan mekanizmalardan bir diğeri de hücrel rejenerasyonu ve mobilizasyonu sağlamaktır. Büyüme faktörlerinin kullanımı bu amaçla en çok araştırılan yöntemlerden biridir.^{17,25}

Kulak zarı perforasyonlarının iyileşmesinde büyüme faktörlerinin kullanılabilirliği gösterilmiştir. Büyüme faktörleri yara iyileşmesini, doku rejenerasyonunu ve normal vücut gelişimini parakrin veya otokrin yolla kontrol eden sinyal proteinleridir. Kan ürünlerinden ve lokal dokulardan salgılanan büyüme faktörleri spesifik hedef hücreleri çoğalmaya veya göç etmeye aktive ederler. Otolaringolojik olarak yapılan çalışmalarda büyüme faktörlerinin hem normal hem de gecikmiş yara iyileşmesinde hızlandırıcı potansiyeli olduğu gösterilmiştir.²⁵

Mondain ve ark.⁴³ guinea piglerde travmatik kulak zarı perforasyonu sonrasında, kulak zarında Epidermal Growth Factor lokalizasyonunu immunohistokimyasal olarak göstermiştir. Kulak zarında EGF seviyesinin perforasyonun 3. gününde en yüksek seviyeye ulaşmış, 5. günde azalmaya başlaması EGF'nin kulak zarı tamirinde rol aldığı görüşünü desteklemiştir.

O'Daniel ve ark.⁴⁵ domuz kulak zarında I125 ile işaretli EGF bağlanmasını incelemiş ve kulak zarının çok katlı skuamöz epitel katında daha yüksek olmak üzere her üç katında da spesifik EGF reseptörlerine sahip olduğunu bildirmiştir. Bu invitro biyokimyasal çalışma kulak zarının EGF için bir hedef olduğu yönündeki düşüncelerle

örtüşmektedir. Aynı çalışmada yer alan diğer bir protokolda iki taraflı total perforasyon oluşturulmuş 4 kedi kulak zarında çalışılmış, dış kulak yolu ve orta kulak boşluğu bir tarafta EGF, diğer tarafta serum fizyolojik emdirilmiş gelfoam ile doldurulmuş ve 6. günde kulak zarı incelendiğinde günlük EGF uygulanan kulak zarında serum fizyolojik uygulanana göre daha fazla epitelyal ve stromal hücre proliferasyonun olduğu bildirilmiştir. Lee ve ark.³⁸ basit deneysel bir protokol oluşturarak kulak zarı perforasyonlarında bakiye kulak zarında mekanik avivasyon yapmadan ve kağıt yaması yerleştirmeden sadece büyük bir gelfoam tabakası yerleştirip gün aşırı 25 µg fosfatla tamponlanmış salinli EGF'yi gelfoam tabakasının üzerine toplam 3 kez uygulamıştır. Tam kapanma EGF ile tedavi edilen kulaklarda %80 iken, kontrol grubunda %20 olarak bulunmuştur.

Yeo ve ark.⁶³ deneysel kulak zarı perforasyonunda tek dozluk 2 µg Platelet-Derived Growth Factor kullanmıştır. PDGF uygulanmış kulak zarlarının tamamı işlem sonrası dönemde hemen kapanmasına rağmen plasebo kulakların bazıları 5. güne kadar kapanmamıştır. Çalışmada 5. güne kadar kapanmayan plasebo kulakları sayısı verilmediği gibi sonuçların istatistiksel değerlendirmesi de yapılmamıştır.

Soumekh ve ark.⁵⁷ çinçilya kulak zarı perforasyonlarında trombosit serbestleştirici faktörün etkisini değerlendirmiştir. Bir kulağa 0.2 ml trombosit serbestleştirici faktör gün aşırı toplam 3 kez damlatılmış, diğer kulak ise aynı şekilde 0.2 ml fosfat tamponlanmış salinle tedavi edilmiştir. Oniki haftalık süre sonunda kulak zarları değerlendirilmiştir. Perforasyonun kapanması açısından her iki kulak arasında istatistiksel fark bulunmamıştır.

Trombositten zengin plazma, trombositlerin invitro ortamda yoğunlaştırılması ve uygulandıkları alanda alfa granülleri içerisinde bulunan çok sayıdaki büyüme faktörünü salgılamaları için aktive edilmeleri esasına dayanan biyolojik bir üründür. Kişinin kendi kanından laboratuvar ortamında hazırlandığı için maliyeti büyüme faktörlerine göre düşüktür ve enfeksiyon riski taşımamaktadır. Yaptığımız literatür araştırmasında TZP'nin çeşitli dokularda ve özellikle kemik doku defektlerinin kapatılmasında kullanıldığını gördük. Ancak kulak zarı perforasyonlarının kapatılmasıyla ilgili hiçbir çalışmaya rastlamadık.

Marx ve ark.⁴¹ tümör cerrahisi sonrasında oluşan mandibuler defektin tedavisinde tek başına kemik grefti uygulaması ile kemik grefti ve birlikte TZP

uygulanmasını karşılaştırdığında, uygulanan TZP'nin kemik dolumu miktarı ve hızını arttırdığını saptamıştır. Anitua E.³ diş çekimi sonrası oluşan boşluğa TZP uygulamış ve hem epitelizasyon hem de kemik dansitesinde artış rapor etmiştir. Kim ve ark.³³ ise yaptıkları bir çalışmada TZP'nin implantlar etrafındaki kemik defektlerinin tedavisinde destekleyici yönde rol oynadığını ortaya koymuştur.

Dere ve ark.¹⁰ yaptıkları çalışmada 14 kobay kulak zarına parasentez bıçağıyla perforasyon yaptıktan sonra değişik doz ve sürelerde bFGF uygulamış ve 7. günde tüm kobayları sakrifiye edip, kulak zarlarını histolojik olarak incelemiştir. Çalışma sonucunda bFGF uygulanan grupta kontrol grubuna göre yaklaşık olarak iki misli kalınlık bulunmuştur. Çalışma grubunda ayrıca belirgin bir hiperplazik reaksiyon bulunmuştur. Bu değişiklik özellikle subepidermal bağ dokusunda belirgin olup, neovaskülarizasyon, fibroblastik proliferasyon ve matriks birikimi ile karakterizedir. Biz de çalışmamızda 7. gün sakrifiye edilen ratların çalışma grubunda neovaskülarizasyonun kontrol grubuna göre anlamlı derecede fazla olduğunu bulduk. Ayrıca günlere bakılmaksızın tüm çalışma grubunda fibroblastik aktivite ve neovaskülarizasyon kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi. Kulak zarlarının kalınlıklarına bakıldığında ise bizim çalışmamızda çalışma ve kontrol gruplarındaki değerler birbirine yakındı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$).

Mondain ve ark.⁴⁴ sıçanlardaki bir perforasyon modelinde bFGF'nin hiçbir taşıyıcı olmaksızın bir kez uygulanmasıyla daha hızlı bir iyileşme yaptığını göstermiştir. Fina ve ark.¹⁴ bFGF'i çoğul dozlarla gelfoam kullanarak guinea piglerde kullanmışlar ve akut perforasyonda plaseboyla karşılaştırıldığında daha hızlı bir iyileşme oranı bulmuşlardır. Konakçı ve ark.³⁴ ratlarda deneysel olarak oluşturdukları subtotal kulak zarı perforasyonlarında hyaluronik asit içeren seprafilm membranının etkinliğini araştırmıştır. Çalışma grubunda kapanma süresi ortalama 7.8 ± 0.6 gün iken, kontrol grubunda 14.9 ± 1.1 gün olarak bulunmuş ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamızda, ratlarda oluşturulan kulak zarı perforasyonlarının kontrol grubunda kapanma süresi ortalama 13.0 ± 2.9 gün, trombositten zengin plazma uygulanan çalışma grubunda kapanma süresi ise ortalama 10.2 ± 2.1 gün olarak bulunmuştur. Kapanma süreleri sonuçlarımız literatür ile

uyumluymdu. Sonuçlarımıza göre trombositten zengin plazma uygulaması ile perforasyon kapanma süresi istatistiksel olarak anlamlı lde kısalmaktadır. ($p < 0.05$)

Çalışma ve kontrol grupları kulak zarı kalınlığı bakımından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmamasına rağmen çalışma grubunda günlerden bağımsız olarak neovaskularizasyon ve fibroblastik aktivite anlamlı oranda artmıştı. Ayrıca neovaskularizasyonun 7. günde çalışma grubunda kontrol grubuna göre yine anlamlı oranda artmış olduğu görüldü. Bu histopatolojik veriler TZP uygulanan çalışma grubunda TZP'nin yara iyileşmesini hızlandırarak perforasyon kapanma süresini kısalttığı görüşünü desteklemiştir. TZP'nin kolay elde edilebilir olması, kişinin kendi kanından hazırlanması ve uygulama kolaylığı cerrahi tedaviye alternatif olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızın, trombositten zengin plazmanın kulak zarı perforasyonlarında kullanımı ile ilgili ilk çalışma olması nedeniyle, trombositten zengin plazmanın uygulanması konusunda yeni çalışmalar gerekmektedir.

SONUÇLAR

- 1- Trombositten zengin plazma uygulanan perfore kulak zarlarında iyileşmenin ortalama 10.2 ± 2.1 gün, spontan iyileşmeye bırakılan kulak zarlarında ise $13,0 \pm 2.9$ günde olduğu görülmüştür. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Trombositten zengin plazma uygulaması kulak zarı perforasyonlarında iyileşme süresini kısaltmaktadır.
- 2- Çalışma grubundaki kulak zarlarının histopatolojik incelemesinde neovaskülarizasyon 7. günde kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ($p<0.05$). Ayrıca sakrifiye edilme günlerinden bağımsız olarak çalışma grubunda neovaskülarizasyon ve fibroblastik aktivitenin, kontrol grubuna oranla daha fazla olduğu görülmüştür ($p<0.05$).
- 3- Çalışma ve kontrol grubunda iyileşme sonrası kulak zarı kalınlıkları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

ÖZET

Kulak zarı perforasyonları insanlarda sık karşılaştığımız klinik bir bulgudur. Perforasyonların kapatılmasında cerrahi tedavi dışında lokal uygulanan ve çoğunlukla büyüme faktörlerinin terapötik etkisinden yararlanan tedavi metodları vardır. Bu çalışmamızın amacı perforasyon oluşturduğumuz rat kulak zarlarında, lokal uygulanan trombosit zengin plazmanın perforasyon kapanma süresine etkisini görmek ve histopatolojik olarak perforasyon bölgesinde yaptığı etkileri belirlemektir.

Kırkdört ratın 88 kulak zarına standart 3mm'lik perforasyon oluşturulup sağ kulak zarlarına trombosit zengin plazma uygulandı. Kontrol grubu olan sol kulak zarları ise spontan iyileşmeye bırakıldı. Ratlardan 20 tanesinin kulak zarı perforasyonu bir ay boyunca günlük otomikroskopik muayene ile takip edildi. Perforasyon kapanma süreleri, trombosit zengin plazma uygulanan sağ kulak zarlarında ortalama 10.2 ± 2.1 gün, spontan iyileşmeye bırakılan sol kulak zarlarında ise 13.0 ± 2.9 gün olarak bulundu. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$).

İkinci kısımda yer alan 24 rat kulak zarı perforasyonlarının kapanma süresinden bağımsız olarak, her grupta 6 rat olacak şekilde 4 gruba ayrıldı ve histopatolojik inceleme amacı ile 3., 7., 14. ve 28. günlerde sakrifiye edildi. Neovaskülarizasyonun 7. günde çalışma grubunda kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görüldü. Ayrıca sakrifiye edilme günlerinden bağımsız olarak çalışma grubunda neovaskülarizasyon ve fibroblastik aktivite, kontrol grubuna oranla anlamlı oranda artış gösterdi. Bu histopatolojik bulgular çalışma grubundaki perforasyonun daha erken kapanmasını destekler görünmektedir. Sonuç olarak trombosit zengin plazmanın kulak zarı perforasyonunun kapanmasında etkili olduğunu, ancak literatürde bu konuyla ilgili çalışma olmadığı için yeni çalışmalarla bu bulguların desteklenmesi gerektiğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Akdaş FV. Çocuklarda Sensörinöral İşitme Kayıpları. In: Çelik O, editor. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi. İstanbul: Turgut Yayıncılık; 2002. p. 57–70
2. Akyıldız AN. Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi. Cilt 1. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 1998. p. 22–62
3. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preperation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 529–535
4. Anitua E, Andia I, Ardanza B, et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91: 4–15
5. Austin D. Anatomy of the ear. In: Ballenger JJ, editor. *Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*. 15 ed. Williams& Wilkins; 1996. p. 838–857
6. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993; 165(6): 728–737
7. Bose B, Balzarini M. Bone graft gel: Autologous growth factors used with autograft bone for lumbar spine fusions. *Adv Ther* 2002;19(4): 170-175
8. Boyapati L, Wang HL. The role of platelet-rich plasma in sinus augmentation: a critical review. *Implant Dent* 2006; 15(2): 160–170
9. Çakır N. *Otolaringoloji, Baş ve Boyun Cerrahisi*. 2 ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1999. p. 1–12
10. Dere H, Ünal A, Özcan İ, et al. Travmatik timpan membran perforasyon iyileşmesinde basic fibroblast growth faktörün etkisinin histolojik incelenmesi. *Türk Otolarengoloji Arşivi* 1997; 35: 33–37

11. Duckert LG. Anatomy of the skull base, temporal bone, external ear and middle ear. In: Cummings CW, Schuller DE, Fredrickson JM, et al. editors. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. 3 ed. St. Louis: Mosby- Year Book; 1998. p. 2533–2546
12. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006; 118(6): 147–159
13. Everts PA, Brown MC, Hoffmann JJ, et al. Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. *Growth Factors* 2006; 24(3): 165–171
14. Fina M, Baird A, Ryan A. Direct application of basic fibroblast growth factor improves tympanic membrane perforation healing. *Laryngoscope* 1993; 103(7): 804–809
15. Floryan KM, Berghoff WJ. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. *AORN J* 2004; 80(4): 668–674
16. Gehring S, Hoerauf H, Laqua H, et al. Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion* 1999; 39: 144–148
17. Gladstone HB, Jackler RK, Varav K. Tympanic membrane wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am* 1995 ; 28(5): 913–932
18. Govaerts PJ, Jacob WA, Marquet J. Histological study of the thin replacement membrane of human tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol* 1988; 105(3–4): 297–302
19. Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent* 2004 ;13(4): 301–309
20. Güneri EA, Tekin S, Yılmaz O, et al. The effects of hyaluronic acid, epidermal growth factor, and mitomycin in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol* 2003 ; 24(3): 371–376

21. Harker LA, Shelton C. Complications of temporal bone infections. In: Cummings CW, Schuller DE, Fredrickson JM, et al. editors. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. 3 ed. St. Louis: Mosby- Year Book; 1998. p. 3047–3076
22. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 1993; 7(1): 52–62
23. Hebel R, Stromberg MW. *Anatomy and embryology of the laboratory rat*. Germany: BioMed Verlag; 1986 p. 219-223
24. Hellstrom S, Laurent C. Hyaluronan and healing of tympanic membrane perforations. An experimental study. *Acta Otolaryngol* 1987; 442: 54–61
25. Hom DB. Growth factors and wound healing in otolaryngology. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 110(6): 560–564
26. Hsu C, Chang J. Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg [Am]* 2004; 29(4): 551–563
27. Johnson A, Hawke M. An ultrastructural study of the skin of the tympanic membrane and external ear canal of the guinea pig. *J Otolaryngol* 1985; 14(6): 357–364
28. Johnson A, Hawke M. The function of migratory epidermis in the healing of tympanic membrane perforations in guinea-pig. A photographic study. *Acta Otolaryngol* 1987; 103(1–2): 81–86
29. Johnson AP, Smallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. A two-dimensional histological study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 1990; 109(5–6): 406–415
30. Joseph E, Hartwig J. Megakaryocyte and platelet structure. In: Hoffman R, editor. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 4 ed. Florida: Churchill Livingstone; 2005. p. 1873–1880

31. Kaftan H, Herzog M, Mieke B, et al. Topical application of transforming growth factor-beta 1 in acute traumatic tympanic membrane perforations: an experimental study in rats. *Wound Repair Regen* 2006; 14(4): 453–456
32. Kent SE, Rhys-Evans PH. Thermal myringotomy in guinea pigs. *J Laryngol Otol* 1987; 101(2): 103–115
33. Kim SG, Chung CH, Kim YK, et al. Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17(1): 86–94
34. Konakçı E, Koyuncu M, Unal R, et al. Repair of subtotal tympanic membrane perforations with Sefrafilm. *J Laryngol Otol* 2004; 118(11): 862–865
35. Koyuncu M. Erişkinlerde Sensörinöral İşitme Kayıpları. In: Çelik O, editor. *Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi*. İstanbul: Turgut Yayıncılık; 2002. p. 71–87
36. Krstic RV. *Human Microscopic Anatomy*. Springer-Verlag; 1991. p. 567
37. Lambert PR, McElveen JT. Tympanoplastic surgery for chronic ear disease. In: Cummings CW, Schuller DE, Fredrickson JM, et al., editors. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. 3 ed. St. Louis: Mosby- Year Book; 1998. p. 3108–3118
38. Lee AJ, Jackler RK, Kato BM, et al. Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor: progress toward clinical application. *Am J Otol* 1994; 15(1): 10–18
39. Ma Y, Zhao H, Zhou X. Topical treatment with growth factors for tympanic membrane perforations: progress towards clinical application. *Acta Otolaryngol* 2002; 122(6): 586–599
40. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001; 10(4): 225–228

41. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85(6): 638–646
42. Merchant SN, Nadol JB. Systemic disease manifestations in the middle ear and temporal bone. In: Cummings CW, Schuller DE, Fredrickson JM, et al., editors. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. 3 ed. St. Louis: Mosby- Year Book; 1998. p. 3088–3108
43. Mondain M, Ryan A. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor are induced in guinea-pig tympanic membrane following traumatic perforation. *Acta Otolaryngol* 1995; 115(1): 50-54
44. Mondain M, Saffiedine S, Uziel A. Fibroblast growth factor improves the healing of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol* 1991; 111(2): 337–341
45. O'Daniel TG, Petitjean M, Jones SC. Epidermal growth factor binding and action on tympanic membranes. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990; 99(1): 80–84
46. Odar İV. *Anatomi*. 12 ed. Ankara: Elif Matbacılık; 1978. p. 543–564
47. Öztürk K, Yaman H, Cihat AM, et al. Effectiveness of MeroGel hyaluronic acid on tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol* 2006; 126(11): 1158–1163
- 48- Öztürk R. *Guinea Pig Kulak Cerrahi Anatomisi*. Dr.Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi. KBB Uzmanlık Tezi, İstanbul 2003
49. Pereira MB, Pereira DR, Costa SS. Tympanostomy tube sequelae in children with otitis media with effusion: a three-year follow-up study. *Rev. Bras Otorhinolaringol (Engl Ed)* 2005; 71(4): 415–420
50. Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg* 2005; 16(6): 1043–1054

51. Plow E, Abrams C. The Molecular basis for platelet function. In: Hoffman R, editor. Hematology: Basic Principles and Practice. 4 ed. Florida: Churchill Livingstone; 2005. p. 1881–1884
52. Putz R, Pabst R. Sobotta İnsan Anatomisi Atlası. 20 ed. München: R. Oldenburg; 1993. p. 366–368
53. Ramalho JR, Bento RF. Healing of subacute tympanic membrane perforations in chinchillas treated with epidermal growth factor and pentoxifylline. *Otol Neurotol* 2006; 27(5): 720–727
54. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001; 12(5): 261–273
55. Roberts JE, Burchinal MR, Collier AM, et al. Otitis media in early childhood and cognitive, academic and classroom performance of the school-aged child. *Pediatrics* 1989; 4: 477–485
56. Somers T, Goovaerts G, Schelfhout L, et al. Growth factors in tympanic membrane perforations. *Am J Otol* 1998; 19(4): 428–434
57. Soumekh B, Hom DB, Levine S, Juhn SK, Antonelli PJ. Treatment of chronic tympanic-membrane perforations with a platelet derived releasate. *Am J Otol* 1996; 17(4): 506–511
58. Stenfors LE, Carlsoo B, Salen B, Winblad B. Repair of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol* 1980; 90(5–6): 332–341
59. Tischler M. Platelet rich plasma. The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. *N Y State Dent J* 2002; 68(3): 22–24
60. Wang SZ, Wang WF, Zhang HY, et al. Analysis of anatomical factors controlling the morbidity of radiation-induced otitis media with effusion. *Radiother Oncol* 2007; 85(3): 463–468

61. Whitman D, Berry R, Green DM. Platelet Gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 1294–1299
62. Yamashita T. Histology of the tympanic perforation and the replacement membrane. *Acta Otolaryngol* 1985; 100(1–2): 66–71
63. Yeo SW, Kim SW, Suh BD, et al. Effects of platelet-derived growth factor-AA on the healing process of tympanic membrane perforation. *Am J Otolaryngol* 2000 ;21(3): 153–160