



T.C.

**S.B. ANKARA DIŞKAPI YILDIRIM BEYAZIT
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KBB KLİNİĞİ**

Eğitim Sorumlusu: Prof. Dr. Hakan KORKMAZ

**SİSTEMİK VE LOKAL ASKORBİK ASİT KULLANIMININ
TRAVMATİK KULAK ZARI PERFORASYONU VE
MİRİNGOSKLEROZ
ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. Akif GÜNEŞ
UZMANLIK TEZİ**

**ANKARA
2013**



**T.C.
S.B. ANKARA DIŞKAPI YILDIRIM BEYAZIT
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KBB KLİNİĞİ**

Eğitim Sorumlusu: Prof. Dr. Hakan KORKMAZ

**SİSTEMİK VE LOKAL ASKORBİK ASİT KULLANIMININ
TRAVMATİK KULAK ZARI PERFORASYONU VE
MİRİNGOSKLEROZ
ÜZERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Akif GÜNEŞ**

**Tez Danışmanı
Op. Dr. Murad MUTLU**

**ANKARA
2013**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca çalışma onuruna eriştiğim, bilgi birikimi, hoşgörü anlayışı ve tecrübesi ile beni aydınlatan, asistanı olmaktan gurur duyduğum sayın hocam Prof. Dr. Hakan KORKMAZ' a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Kulak Burun Boğaz hekimliğine ilk başladığım 3. Kulak Burun Boğaz Kliniğinde ilk günden itibaren her konuda desteklerini esirgemeyen hocam Doç. Dr. Muharrem DAĞLI' ya, Eğitimim sırasında kendilerinden pek çok şey öğrendiğim, bana daima destek olan, hocalarım Prof. Dr. İstemihan AKIN ve Prof. Dr. Ali ÖZDEK' e, çalışmaları ve hoşgörüsü ile her zaman örnek aldığım Doç. Dr. Güleser SAYLAM' a,

Tez çalışmalarımın başladığı ilk günden beri hep yanımda olan, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım tez danışmanım ve abim Op. Dr. Murad MUTLU' ya

Eğitimim sırasında kendilerinden pek çok şey öğrendiğim, bana daima destek olan Doç. Dr. Cem SAKA' ya, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum başasistanlarımız Doç. Dr. Emel Çadallı Tatar, Op.Dr. Banu Tijen CEYLAN, Op.Dr. Ömer BAYIR, Op.Dr. Kemal KESEROĞLU' na, her konuda bana destek olan Op.Dr.Ali GÜVEY' e ve kliniğimizde birlikte çalışmaktan onur duyduğum çok değerli uzmanlarımıza, hayatımın en önemli dönemlerinden birini paylaştığım sevgili asistan arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım servisimizin ve ameliyathanemizin değerli hemşire ve personellerine, odyoloji ünitesi çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca yanımda olan ve maddi – manevi hiçbir desteğini esirgemeyen annem Songül GÜNEŞ, babam Yılmaz GÜNEŞ ve kardeşlerime ve çalışmam süresince beni yalnız bırakmayan ve bana her zaman destek olan eşim Nurcan GÜNEŞ' e teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Akif GÜNEŞ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İnsan Timpanik Membranı	3
2.2. Sıçan Kulak Anatomisi.....	4
2.3. Histolojik Yapı.....	5
2.4. Yara İyileşmesi ve Miringoskleroz Oluşumu	6
2.5. Etyopatogenez	7
2.5.1. Enflamasyon	8
2.5.2. İmmünolojik Faktörler.....	9
2.5.3. Mekanik Faktörler	9
2.5.4. Orta Kulak Basınç Değişiklikleri	9
2.6. Sklerotik Plak Histolojisi.....	9
2.7. Sınıflandırma	10
2.8. Miringoskleroz Dağılımı.....	10
2.9. Tanı	11
2.10. Miringosklerozun İşitme ile İlişkisi.....	11
2.11. Tedavi.....	11
2.12. Serbest Radikaller Ve Serbest Oksijen Radikalleri.....	12
2.13. Askorbik Asit.....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
4. BULGULAR.....	25
4.1. Histopatolojik Değerlendirme.....	25
4.2. Lamina Propriada İnflamasyon.....	27
4.3. Timpanik Membranın Kalınlığı (mikron).....	29
4.4. Miringoskleroz Dağılımı	30
4.5. Lamina Propria Ödemi.....	31

4.6. Lamina Propria Neovaskülerizasyonu	32
5. TARTIŞMA.....	33
6. SONUÇLAR	39
7. ÖZET	40
SUMMARY.....	42
8. KAYNAKLAR	44
9. ÖZGEÇMİŞ.....	55
10. ETİK KURUL ONAYI.....	56



KISALTMALAR DİZİNİ

MS	: Miringoskleroz
VT	: Ventilasyon Tüpü
TS	: Timpanoskleroz
EOM	: Efüzyonlu Otitis Media
AOM	: Akut Otitis Media
KOM	: Kronik Otitis Media
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
ÖT	: Östaki Tüpü
PF	: Pars Flaksida
PT	: Pars Tensa

RESİMLER DİZİNİ

Resim 2. Sağ timpanik membranın şematik çizimi.....	3
Resim 1. Sağ timpanik membranın görünümü	3
Resim 3. Sıçan orta kulağı. Lateralinden, timpanik membran kaldırılmış haldedir ve iki adet rotasyon aksına sahiptir.	4
Resim 4. Wistar Albino Erkek Rat	19
Resim 5. Çıkarılan rat bullası	22
Resim 6. Hazırlanan spesmenlerin %10'luk formaldehit solüsyonu içerisine koyulmuş hali	23
Resim 7. Topikal askorbik asit uygulanan grupta X 40 büyütmede H&E ile boyalı timpanik membran örneği	26
Resim 8. Sistemik askorbik asit uygulanan grupta X 40 büyütmede H&E ile boyalı timpanik membran örneği	26
Resim 9. Sadece parasentez uygulanan kontrol grubunda X 40 büyütmede H&E ile boyalı timpanik membran örneği	26

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Serbest oksijen radikalleri	12
Tablo 2. Çalışmadaki tüm histopatolojik veriler	25
Tablo 3. Lamina propriadaki inflamasyon şiddetinin dağılımı.....	27
Tablo 4. Lamina propriadaki inflamasyon şiddetinin gruplardaki dağılımı	28
Tablo 5. Gruplardaki total timpanik membran kalınlığı ortalamaları	29
Tablo 6. Histopatolojik incelemeye göre miringoskleroz bulguları.....	30
Tablo 7. Histopatolojik incelemeye göre Lamina propria tabakasındaki ödem bulguları.....	31
Tablo 8. Histopatolojik incelemeye göre lamina propria tabakasındaki yeni damarsal oluşum bulguları.....	32

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Timpanik membran (TM) perforasyonu klinik olarak sık görülen bir durumdur. Tahmini insidansı %1'in altında olmasına rağmen gerçek insidansın daha yüksek olduğu bilinmektedir.(1)

Timpanik membranda perforasyona sebep olan nedenler arasında ilk sırada enfeksiyon gelirken, ikinci sıklıkta travmalar gelmektedir. Travmalar ise genellikle çarpmalar, kesici alet yaralanmaları, barotravmalar, yüksek sese maruz kalmak ve cerrahi prosedürler (parasentez, ventilasyon tüpü uygulamaları) olarak sıralanabilmektedir (2).

Ventilasyon tüpü uygulamaları çocukluk yaş grubunda uygulanan en sık cerrahi girişimlerden biridir ve medikal tedavinin yetersiz olduğu efüzyonlu otitis media olgularında kullanılmaktadır. Efüzyonlu otitis media tedavisinin altın standart uygulamasıdır (3,4). Uygulanan bu cerrahi prosedürün erken ve geç dönem çeşitli komplikasyonları mevcuttur. En sık karşılaşılan uzun dönem komplikasyon sklerotik plak oluşumudur. Bu sklerotik plaklara kulak zarında zedelenmeye neden olan tüm patolojilerde sıklıkla rastlanmaktadır. Sklerotik plaklar sadece timpanik membranda ise miringoskleroz (MS) olarak isimlendirilir. Timpanoskleroz ise orta kulak ve iç kulak yapılarını içine alan klinik bir antitedir (5,6,7).

Timpanoskleroz (TS) timpanik membranın ve orta kulağın bağ dokusunu etkileyen dejeneratif bir patolojidir. Timpanik membran lamina propria tabakasındaki hyalinizasyon ve kollajen lif artışı ile karakterizedir. Ayrıca bu oluşum üzerine kalsiyum ve fosfor birikimi kristalizasyona ve skleroza neden olur (8,9).

Timpanoskleroza neden olan sebepler ve oluşum mekanizmaları net olarak ortaya konamamıştır. Ancak enfeksiyon, travma, parasentez, ventilasyon tüpü uygulamaları, alerjik reaksiyonlar, hipersensitivite reaksiyonları, bakteriyel ürünler, tuba östaki patolojileri, kalıtsal patolojiler ve kolesteatom sebepler arasında sayılmaktadır (2,8,9).

Parasentez sonrası oluşan hiperoksik durumun ve oluşan serbest oksijen radikallerinin (SOR) skleroz gelişimi üzerinde etkili olduğu

bilinmektedir. Miringotomi sonrası orta kulak oksijen konsantrasyonundaki bu artış SOR oluşumu için gereklidir. Oksijen konsantrasyonundaki artış sonucu oluşan SOR üretimi ortama hücum eden enflamatuvar hücreler tarafından sağlanır. Bu nedenle ortamdaki enflamatuvar hücre sayısı arttıkça SOR üretimi de artacaktır (10,11,12,13,14). Yapılan çalışmalarda timpanik membranda zedelenmeye neden olan travma ya da parasentez sonrası skleroz oluşumunu önlemeye yönelik çeşitli antioksidan maddeler denenmiş ve oluşan serbest oksijen radikallerinin kantitatif ölçümü yapılarak skleroz gelişiminin azaldığı gösterilmiştir (10,11).

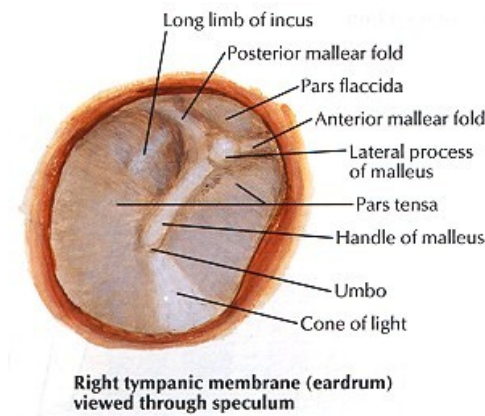
Askorbik asit güçlü bir redüktan ajan ve antioksidandır (15). Askorbik asit, tip 1 ve 3 kollajen sentezini keratositlerden in vitro olarak artırmaktadır (16). Bu özelliğinden dolayı yara iyileşmesi üzerine de etkileri vardır. Literatüre bakıldığında kolon, kornea, gingiva ve cilt gibi dokularda yara iyileşmesi üzerine olumlu etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur (16,17). Askorbik asidin kulak zarında uygulanmasını inceleyen bir çalışmada, sıçan timpanik membranına topikal askorbik asit uygulamanın skleroz gelişimi üzerine olan etkisi incelenmiş ve askorbik asidin miringoskleroz gelişimini azalttığı gösterilmiştir (18)

Literatür incelendiğinde sistemik ve lokal askorbik asit kullanımının travmatik kulak zarı ve miringoskleroz üzerine etkisini karşılaştıran hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışmada ise miringotomi uygulanan sıçanların çıkarılan kulak zarlarının histopatolojik incelemesi yapılarak, topikal ve sistemik askorbik asit kullanımının skleroz gelişimi üzerine etkisinin kıyaslanması amaçlanmıştır.

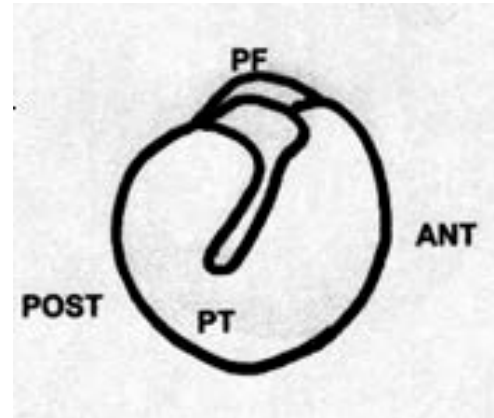
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsan Timpanik Membranı

Timpanik membran dış kulak yolu ile orta kulak boşluğunu ayırır. Kalınlığı 0,1 mm, uzunluğu 10-11 mm, genişliği ise 8-9 mm. dir (19). Timpanik bölümü sulkus timpanikusa oturur. Buna timpanomeatal halka denir. Halkanın üst ucu açık kalır (rivinius çentigi). Kulak zarı sulkus timpanikus içine anulus fibrozis ile tespit edilmiştir (19). Timpanik kemiğin her 2 uzantısının bitim noktalarından malleusun başına doğru iki plika uzanır ve bunlar kulak zarını malleusa bağlar. Bunlara plika malleolaris anterior ve posterior adı verilir (19). Zarın timpanik kemik içindeki parçası pars tensa, gergin ve esas titreşen kısmıdır. Rivinus çentiğini dolduran gevşek kısma ise pars flaksida (sharpnell membranı) adı verilir. Kulak zarının konumu düz değildir. Pars tensanın arka kenarı dışa daha yakın, ön kenarı ise daha uzaktır. Kulak zarının pars tensa parçasında, ortada yukarıdan aşağıya doğru uzanan malleusun kulak zarı içerisindeki parçası olan manubrium mallei bulunur. Manubrium mallei yukarıdan aşağıya, önden arkaya doğru durmaktadır. Kulak zarı konkav şekildedir ve çukur yerinde umbo adı verilen manibrium malleinin ucu bulunur (19).



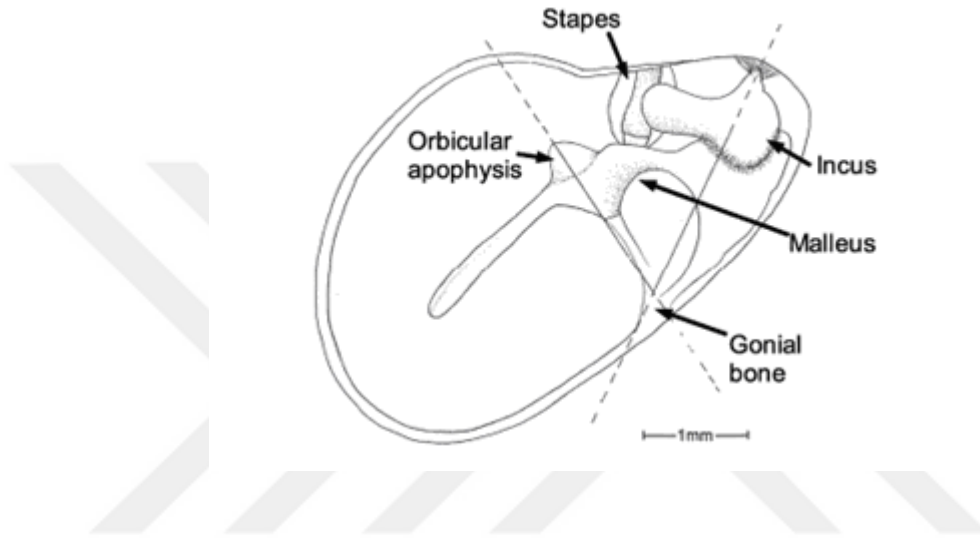
Resim 1. Sağ timpanik membranının görünümü



Resim 2. Sağ timpanik membranının şematik çizimi

2.2. Sıçan Kulak Anatomisi

Sıçandaki kemikçikler insandakilere göre çok daha küçüktür ve insandekilerin $\frac{1}{4}$ boyundadır (20). Sıçan orta kulak anatomisi, Fleischer tarafından (1978) tanımlanmıştır ve iki ayırt edici özelliği vardır. Sıçanlarda malleus, gonial bone bölgesinde timpanik anulusa yapışıktır ve malleus başı üzerinde orbiküler apofiz olarak adlandırılan geniş bir yapı bulunmaktadır.



Resim 3. Sıçan orta kulağı. Lateralinden, timpanik membran kaldırılmış haldedir ve iki adet rotasyon aksına sahiptir.

Timpanik membran alanı yaklaşık 10 mm² dir. Pars tensa ve pars flaksidanın boyutları da tamamen farklıdır. İnsanlar, timpanik membranın total büyüklüğü ile kıyaslandığında çok küçük bir pars flaksidaya sahip iken, sıçanlarda pars flaksida timpanik membranın $\frac{1}{4}$ ile $\frac{1}{3}$ ' ünü oluşturur (Resim 3). Sıçan orta kulağının küçük bullası ve genellikle kapalı olan, horizontale yakın östaki tüpü (ÖT) vardır. ÖT mukozası büyük çoğunlukla goblet hücreleri, daha az miktarda da müköz glandlar içerir. Sıçan ÖT açılma basıncı insandakine benzer. ÖT iki ayrı silyalı ve sekretuar kanal yoluyla epitimpanik bölgeye bağlıdır. Sıçan orta kulağı temporal kemikte yerleşmiş ve iyi korunmuştur. Ancak timpanik membrana muayene için sıradan bir otomikroskop ile kolayca ulaşılabilir. Sıçan orta kulağının üç boyutlu yapısı insandaki yapıya benzer. Ancak mastoid hücreler yerine kavite tabanından

çıkıntı yapan timpanik bulla mevcuttur. Pars tensa ve geniş pars flaksidası ile timpanik membran lateral duvarın büyük kısmını oluşturur. Medial duvarda promontoryum, yuvarlak pencere, stapes ile birlikte oval pencere ve ÖT'nün timpanik ağzı yerleşmiştir. Silyalı ve sekretuar epitelyum ile döşeli iki kanal dışında timpanik kavite, basit, squamöz-küboidal, silyasız epitelyum ile döşelidir. Patolojik koşullar esnasında bu basit epitelyum değişip silyalı ve sekretuar hücreler halinde görülür. İnsanlarda malleus inkus kompleksi genellikle en azından düşük frekanslarda, iki asıcı ligaman doğrultusunda olan rotasyonel aksa sahiptir. Bu iki ligaman; anterior malleolar ve posterior inkudal ligamanlardır. Fleischer'a (1978) göre, mikrotip kulakta, malleusun timpanik anulusa belirgin fiksasyonuna rağmen kompleks bir şekilde rotasyon yapabilir. Bu ilişki ve inkus kısa kolunun bağlantısı insandakine benzer rotasyonel aks oluşturur. Sıçanlar ile insanlar arasındaki farklardan bir tanesi, sıçanlarda manibrumun, rotasyon aksına paralele yakın yerleşmesidir. Fleischer (1978), genişletilmiş model üzerinde yaptığı çalışmalarda orbiküler apofizin meydana getirdiği ek kitlenin, malleus - inkus kompleksinin yerini değiştirdiğini bulmuştur. Bu da yüksek frekanslarda malleusun transvers bölümü doğrultusunda ikinci bir rotasyon aksı oluşturmaktadır. Bunlara dayanarak mikrotip kulakların iki tane rotasyon aksı olduğu ve malleusların iki adet net olarak tanımlanmış vibrasyon modu olduğu sonucuna varmıştır.(21)

2.3. Histolojik Yapı

Timpanik membran, histolojik olarak dışta epitel, ortada fibröz ve içte mukoza tabakasından oluşan üç katlı bir yapıdır. Epitel tabakasını, dış kulak yolu cildi ile devamlılık gösteren çok katlı yassı epitel hücreleri oluşturmaktadır. En içte bulunan epitel tabakasını ise orta kulak mukozası ile devamlılık gösteren tek katlı epitel hücreleri oluşturmaktadır. İki epitel tabakası arasında yerleşmiş olan fibröz tabakaya lamina propria da denilmektedir. Lamina propria, timpanik membranın pars tensa ve pars flaksida kısımlarında histolojik farklılıklar göstermektedir. Pars flaksida da bulunan orta fibröz tabaka, dışta radial ve içte sirküler seyirli kollajen liflerden oluşmaktadır. Radial ve sirküler lifler orta fibröz tabakayı subepitelyal ve

submukozal katlara ayırır. Bu katlarda fibroblastlar, endotelial hücreler ve sinirler bulunmaktadır. Pars flaksidanın orta fibröz tabakasını ise herhangi bir düzenlemeden yoksun, gevşek bir şekilde yerleşmiş olan kollajen ve elastin lifler oluşturmaktadır. Pars flaksidanın lamina propriası, pars tensadan daha kalın ve daha az organize olmasıyla ayrılır. Pars tensa lamina propriası, pars flaksidaya oranla daha ince olmasına rağmen daha sert, elastik ve dayanıklı bir yapıya sahiptir (19,22).

Yapılan çalışmalarda sıçan ve insan timpanik membranlarının benzer histolojik yapıya sahip oldukları gösterilmiştir (22,23). Lamina propriayı oluşturan radial ve sirküler liflerin dizilim paternindeki benzerlik dikkat çekmektedir. Bu nedenle timpanik membran üzerine yapılan deneysel çalışmalarda sıklıkla sıçan tercih edilmektedir.

2.4. Yara İyileşmesi ve Miringoskleroz Oluşumu

Spontan iyileşme timpanik membran perforasyonlarında sık görülür. Timpanik membranda görülen epitelyal proliferasyon ve migrasyon aktivitesi perforasyonların spontan iyileşmesini açıklar (24). Perforasyonun büyüklüğü, çeşidi, yaş, hastanın beslenme ve immünite durumu perforasyonların spontan kapanmasını etkileyen faktörlerdir (25). Başlangıçta trombositler yaranın içine hücum ederler, hücrel atıklarla karşılaşır ve trombüs oluşumuna neden olurlar. Süreç vazokonstriksiyon ve hemostaz oluşumu ile devam eder. İlk birkaç saatten sonra vasküler permeabilite artar. Böylece nötrofiller, makrofajlar ve sitokinlerin yara bölgesine doğru migrasyonu başlar (26).

Perforasyonların iyileşme sırasında perforasyon kenarlarından eksudatif (intertisyel sıvı, lenf ve kan elemanları) mayi açığa çıkar. Skuamöz epitel proliferasyonu ve perforasyon merkezine migrasyon bu süreci takip eder (27). Epitel dokunun perforasyon kenarlarına göçü defektif alanın kapanmasına neden olur. Proliferatif sürecin düzenli kollajen tabakaya dönüşmesi ve yeniden şekillenme, hadiseyi takip eden süreçtir (28). Ayrıca içteki mukozal alanlar içeriye doğru büyümeye devam eder. Sıçan timpanik membranındaki perforasyonun iyileşme sürecinde, erken dönemdeki epitelyal

proliferasyon perforasyon kenarlarında değil, perforasyon alanından uzak olan anulus ve manubrium civarında başlar (29). Periferde prolifere olan epitel hücreleri, perforasyon alanında biriken keratinin eşliğinde perforasyon merkezine doğru ilerleyerek perforasyonu kapatırlar.

Yeni membran epitel tabakası, düzensiz fibriller tabaka ve mukozal yüzeyden oluşur (30). Fibröz tabakanın yeniden şekillenmesiyle perfore alanda ince bir zar yapısı oluşur. Perforasyon alanının perifer bölgelerinde ise, timpanik membran kalınlığının artmış olduğu görülmektedir (27,31). Enflamasyondan sonra oluşan fibroblast aktivitesi ve kollajen sentezi, timpanik membran kalınlığının artmasına neden olur. Miringoskleroz, timpanik membrandaki yara iyileşme sürecinin farklı dönemlerinde ortaya çıkabilen geri dönüşümsüz bir durumdur. Yapılan çalışmalarda perforasyon sonrası dokuzuncu saatten itibaren miringosklerozun başladığı bildirilmiştir (32). Makrofaj infiltrasyonu, perforasyon sonrası başlayan enflamatuvar sürecin dokuzuncu saat gibi erken döneminde gözlenen, major histolojik bulgusudur. Bu antite miringoskleroz ve makrofaj infiltrasyonu ilişkisini açıklar. Enflamasyonun erken döneminde aktive olan makrofajlardan salınan NO ve diğer mediatörlerin neden olduğu doku hasarının iyileşmesi fibrozis ile sonuçlanır. Artmış fibroblastik aktivite ve kollajen sentezi hiyalinizasyonu ve de sonrasında oluşan kalsifikasyon, miringoskleroza neden olur. Miringoskleroz oluşumuna neden olan süreç eksudasyon, granülasyon, fibrozis, hiyalinizasyon ve kalsifikasyon olarak sıralanabilir. Hiyalinizasyon ve/veya kalsifikasyon görülmesi miringoskleroz olarak değerlendirilebilir ve kalsifikasyon bu sürecin geri dönüşümsüz fazıdır (33).

2.5. Etyopatogenez

Miringoskleroz etyopatogenezini açıklamaya yönelik çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır. Etyopatogenezde suçlanan kriterlere baktığımızda :

2.5.1. Enflamasyon

Enflamasyon alanında biriken enflamatuvar hücrelerin dejenere olması ve epitel hücrelerden geçerek fibröz tabakaya yerleşip orada dejenerasyona sebep olması, kollajen sentezinde artışa neden olur ve orta fibröz tabakasında düzensizlik başlar. Bu dejenere olmuş kollajen yığınlarının olduğu bölgeye kalsiyum çökmesi ve neticesinde makroskopik plakların ortaya çıkışı ile süreç sonlanır (34,35,36). Enflamatuvar süreçte orta kulak boşluğunda biriken eksuda ve bu sıvıdaki hidrolitik enzimler ile birlikte sklerotik plak oluşumunun geliştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (36,37). Sert bir fibröz tabaka skleroz gelişimi için şarttır. Bu önemli süreç dikkate alındığında sklerotik plak gelişiminde rol oynayan faktörler açıklanabilir. Sklerotik plak oluşumu en sık KOM' da gelişirken, EOM ve süpüratif OM'da da geliştiği gösterilmiştir. Kronik otitis mediada skleroz gelişimi, timpanik membranın ve orta kulak mukozasının immunolojik süreçlere maruz kalmasıyla açıklanabilir. Süpüratif otitis mediadaki skleroz ise inflamasyon alanına polimorfonükleer lökositlerin, makrofajların ve lenfositlerin yoğun göçü ile oluşur. Bu hücreler dokularda hidroliz ve hasara neden olan enzimleri salgırlar. Bu durum fibröz dokuda hasara neden olur (36,37,38). Sert ve iyi düzenlenmiş bir fibröz tabakanın olmaması skleroz oluşumuna engel teşkil eder. Yapılan bir çalışmada gösterilmiştir ki, kollajen yıkımını sağlayan enzimatik reaksiyonların süpüratif otitis media olgularında daha çok olması, süpüratif otitis media olgularında sklerozun daha az olmasına yol açmaktadır. Bu kollajen yıkımı daha az skleroza neden olur. Mastoid kavite ve orta kulak boşluğunda, timpanik membrana göre daha az subepitelyal tabaka daha az skleroz gelişimini açıklayabilir. Bu durum sklerozun genellikle pars tensa ve santral yerleşimli olmasını izah edebilir. Pars tensa ve özellikle de posterior ve anteroinferior timpanik membran kadrnlarında fibröz tabaka sert ve iyi organize olmuştur. Anulus, timpanik membran posterosuperior kadrnı ve pars flaksida da ise fibröz tabakanın zayıf olması, sklerotik plak oluşumuna karşı direnç sağlar (36,37,39).

2.5.2. İmmünolojik Faktörler

İmmünolojik hipersensitivite reaksiyonları, sklerotik plak gelişiminde suçlanan diğer bir faktördür. Sklerotik plak oluşum süreci, tekrarlayan immünolojik uyarılar sonucunda oluşabilmektedir. Tekrarlayan antijenik uyarılar orta kulakta kronik bir enflamasyona neden olur ve skleroz gelişimini tetikleyebilir. Ayrıca lökosit antijenlerinden olan B35 ve DR3 serum düzeylerinin yüksek olması, immünolojik faktörlerin skleroz oluşumu üzerine etkili olduğunu göstermektedir (40,41,42).

2.5.3. Mekanik Faktörler

Sklerotik plaklar kulak zarında ve orta kulakta hareket kısıtlılığına neden olur. Yapılan çalışmalar sklerotik plakların bu hareketliliği azalttığını gösterirken, kulak zarında hareket azlığına yol açan patolojilerin de skleroz oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir. Timpanik membran retraksiyonlarında hyalinizasyon ve kalsifikasyon daha sık gelişebilmektedir. Bu nedenle umbo, kulak zarının en hareketli ve sklerozun en az olduğu bölgedir (40,41).

2.5.4. Orta Kulak Basınç Değişiklikleri

Travma ya da cerrahi sonrası timpanik membranda kanamalar oluşur. Ayrıca orta kulak oksijen basıncında değişiklikler oluşur. Oksijen basıncındaki değişiklikler serbest oksijen radikellerinin oluşmasına ve skleroz oluşumuna yol açmaktadır (42,43).

2.6. Sklerotik Plak Histolojisi

Makroskopik olarak çoğu kauçuk kıvamında ve lameller yapıda, soğan zarı gibi üst üste yığılmış plaklar seklindedir. Işık mikroskopisi submukozal olarak yerleşmiş plaklarda bol miktarda kollajen fissürlerle kesilmiş halde görünür. Elektron Mikroskopik incelemede ise submukozal olarak yerleşmiş plaklarda bol miktarda kollajen fibrilleri bulunur ve anormal kollajen olan yerlerde distrofik kalsifikasyonlar saptanır. Fibroblastlar içindeki organellerde

de değişiklikler vardır. Hücre içinde ve dışındaki veziküllerde çok miktarda kalsiyum ve az miktarda fosfat kristalleri görülür (38,41).

2.7. Sınıflandırma

Muayene ve semptomatik bulgulara göre sınıflandırıldığında, histolojik timpanoskleroz tanımı ile, yukarıda anlatılan histolojik parametreleri karşılayan doku örnekleri anlatılmaktadır. Klinik timpanoskleroz denildiğinde ise, orta kulağın herhangi bir yerinde gözlenen ve cerrahi gerektirmeyen, otoskopi veya otomikroskopi ile görülebilen plak varlığı anlaşılmaktadır. Cerrahi timpanoskleroz deyimi ile de, timpanik membranda veya orta kulak boşluğunda cerrahi gerektirecek düzeye ulaşmış timpanoskleroz söz konusudur.

Timpanik membranın durumuna göre sınıflandırma ise şöyledir : perfore zar varlığında açık timpanoskleroz , timpanik membranın sağlam olduğu durumlarda ise kapalı timpanoskleroz tanımlanmaktadır. Ancak timpanik membranda sklerotik plak olması şart değildir.

Ayrıca kemikçik zincirin tutulumuna (wielinga ve kerr) göre de sınıflandırılma yapılmaktadır: Herhangi bir fiksasyon yapmamış olgular tip 1 olarak tanımlanmaktadır. Tip 2 dediğimizde malleus-inkus kompleks fiksasyonu olan - ancak stapes taban fiksasyonu olmayan olgular tanımlanmaktadır. Malleus-inkus kompleks fiksasyonu olamayan ancak stapes taban fiksasyonu olan olgular tip 3 iken, malleus-inkus kompleksi ile stapes taban fiksasyonu olan olgular ise tip 4 olarak nitelendirilir.

2.8. Miringoskleroz Dağılımı

Miringoskleroz timpanik membranın en sık anteroinferior ve posteroinferior kadrantlarında görülür. En az posterosuperior kadranda yerleşir. Ayrıca pars flaksida da görülmez. Sklerotik plakların orta kulak boşluğundaki dağılımına baktığımızda malleus başı ve pretimpanik reses arasında, malleus başını fikse ederek görülebilir. Ayrıca malleus başı ve/veya inkus gövdesi ve tegmen timpani arasında, oval pencerede, interossiküler

fold'da oval pencere ve stapes'e yakın, Supratubal reces ve östaki orifisinde gözlenebilmektedir. (42,43).

2.9. Tanı

Açık timpanosklerozda, orta kulakta sklerotik plakların varlığı ve histolojik inceleme ile tanı konulabilir. Miringosklerozda membran üzerinde matür plakların varlığı tanı için yeterlidir. Kapalı timpanosklerozda ise eğer timpanik membranda sklerotik plak yoksa ve otoskopik muayenede membranın arkasından plaklar ayırt edilemiyorsa tanı koymak oldukça güçtür (34,35).

2.10. Miringosklerozun İşitme ile İlişkisi

Miringosklerozda küçük tabakalar duyma kaybına neden olmaz. Kimi plaklar bazı frekanslarda çok hafif 1-2 dB kayıp meydana getirebilir. Daha büyük tabakalar, genç yaşlarda az önem taşıyan - fakat yaşlı hastalarda özellikle presbiakuzi kombinasyonu düşünüldüğünde önemli kabul edilebilecek 5-10 dB duyma kaybına neden olabilirler (42,43). Timpanoskleroz ise, kemikçiklerin etkilenme durumları ölçüsünde değişik derecelerde duyma kaybı meydana getirebilir. Buna karşılık işitme kaybının şiddeti ile plakların yaygınlığı ve yapısı arasında ilişki olmadığını savunan yayınlarda vardır (42,43).

2.11. Tedavi

Koruyucu tedavide otitler, timpanoskleroz olasılığı da düşünülerek etkin şekilde tedavi edilmelidirler. Ayrıca sık otite neden olabilecek faktörler ortadan kaldırılmalıdır. Gereksiz ventilasyon tüpü uygulamalarından da vazgeçilmelidir. Timpanosklerozun medikal tedavisi olarak distrofik kalsifikasyonları önlemek için kalsiyum antagonistleri, membran stabilizatörleri, antienflamatuar etkilerinden dolayı kortikostreoidler ve prostaglandinler üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Cerrahi tedavi ise işitmeyi

düzeltilmek, rekürren enfeksiyonları önlemek, etkin işitme cihazı kullanımını sağlamak için yapılabilir (41,42).

2.12. Serbest Radikaller Ve Serbest Oksijen Radikalleri

Canlı hücrelerin yapıtaşlarını oluşturan moleküllerin atomları, kovalan bağlarla birbirine bağlıdır. Bu tip bağlar paralel olmayan yörüngelere sahip iki komşu atomun arasındaki elektronun ortaklaşa kullanılmasına dayanmaktadır. Yeterli bir enerji kaynağı ile bu bağ kopabilir. Bu tip bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, kimyasal reaktiviteleri yüksek molekül veya atomlar “serbest radikal” olarak adlandırılırlar (44,45). Radikal, eşleşmemiş elektronun atomik yada moleküler orbitali kendi başına işgal etmesidir (24). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen (O_2), elektron alıcısı olarak, aerob organizmaların yaşamı için gerekli bir maddedir. Memeliler hücrelerindeki ATP üretiminin büyük bir kısmını mitokondrial elektron transport sisteminde, oksijenin dört elektronunun su (H_2O) oluşturmak üzere indirgenmesiyle elde ederler. Fakat bu süreçte oksijenin %1-3'ü tam olarak suya dönüşemez ve ara ürün olarak serbest oksijen radikalleri ve bunların da çeşitli reaksiyonları ile serbest oksijen radikalleri (SOR) meydana gelir (Tablo 1) (46,47).

Tablo 1. Serbest oksijen radikalleri

Süperoksit radikali	Hidrojen Peroksit
Hidroksil radikali	Lipit Hidroperoksit
Hidroperoksil radikali	Hidrokloröz Asid
Alkosil radikali	Singlet Oksijen
Thiyl radikali	Ozon
Peroksil radikali	Peroksinitrit
Nitrik Oksit	

Canlılığın devamının zorunlu bir parçası olan SOR enzimatik reaksiyonlar ve biyolojik fonksiyonlar için gereklidir (48). Ancak, radikalın yapısına ve etkili olduğu yere göre hücre sel yapılar risk altındadır (49). Özellikle DNA, lipid ve proteinler serbest radikaller için hedef yapılardır. Hücre zarında yer alan lipidlerin oksitlenmesi lipid peroksidasyonuna, protein metabolizmasında agregasyona, parçalanmaya ve kırılma ile biyokimyasal işlevlerde bozulmalara, DNA düzeyinde oluşan oksidasyon etkisi ile hücre ölümü ya da mutasyonlara neden olabilirler (50,51,52).

Oksidan moleküller yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal endojen enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri tarafından etkisiz hale getirilmektedir (53). Böylece sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların etkisizleştirme gücü bir denge içindedir (52). SOR belirli bir seviyenin üzerine çıktığında veya antioksidan savunma sistemleri yetersiz kaldığında ciddi doku hasarı oluşabilir (54). Bu zararlı etkilerin yanında oksijen radikalleri toksik etkilerini daha çok cerrahi alan gibi doku travmalarını izleyen dönemlerde gösterirler (49,52). Bütün bu etkilerinin yanında serbest radikaller kendileriyle reaksiyona giren molekülleri de serbest radikallere dönüştürerek hasar zincirinin yayılmasını sağlar ve böylece otokatalitik reaksiyonları başlatırlar (51).

Serbest radikaller endojen olarak vücutta üretilbildikleri gibi dış kaynaklı da olabilirler. Bu nedenle serbest radikallerin kaynaklarını endojen ve eksojen olmak üzere iki ana başlık altında toplayabiliriz (51). Endojen kaynaklar; fagositler, nötrofiller, makrofajlar, mitokondrial elektron transport sistemi, mikrozomal elektron transport sistemi, ksantin oksidaz, araşidonik asit metabolizması ve metallerden oluşmaktadır. Eksojen kaynaklar ise radyasyon, hava kirliliği, sigara dumanı, hiperoksik çevre ve farmakolojik bazı elementlerden oluşmaktadır. Aerobik organizmalarda serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir (51). Moleküler oksijen birer elektronu eksik iki oksijen atomundan oluşmaktadır. Ancak bu molekülün reaktif bir özelliği yoktur ve her iki atom bir denge halindedir. Oksijen molekülünün univalan indirgenmesi ile süperoksit anyon radikali oluşur (48,55). Süperoksit radikali kuvvetli bir indirgeyicidir ve süratle iki elektron transferi ile hidrojen

peroksite dönüşür. Bu reaksiyon spontan veya süperoksit dismutaz enziminin katalizi ile gerçekleşir (48,52). Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmamakla beraber hem membranlardan kolaylıkla geçer hem de en reaktif ve hasar verici olan hidroksil radikalının oluşumuna yol açar. Özellikle nötrofiller, içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla hidrojen peroksiti klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl (hipokloröz asit)'e dönüştürür. Ayrıca lipofilik serbest radikal olan nitrik oksit, damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenir. NO, oluşmuş olan SOR ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) oluşturmaktadır (48).

SOR, membran lipidlerinin peroksidasyonuna, geçirgenliğin artmasına, enzimlerin ve yapısal proteinlerin sülfidril gruplarının oksitlenmesine ve çapraz bağlanmasına, antiproteazların inhibisyonu sonucu proteolitik enzimlerin aktivasyonuna, DNA yapısının bozulmasına, kırılmasına ve kısalmasına, ayrıca mukopolisakkaridlerin depolimerizasyonuna, proteoglikan ve glikozaminoglikanların da oksidatif zedelenmelerine neden olarak doku hasarı oluşturlar (51,52).

Biyomoleküllerin tüm sınıfları serbest oksijen radikallerinden etkilenir ama en hassas olanı lipidlerdir (51). Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren otokatalitik bir reaksiyondur ve oluşan hasar geri dönüşümsüzdür (49,51). Lipid peroksidasyonu, serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asit zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlar (49,51). Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid peroksit radikalleri (LOOH), membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomunu alarak lipid hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşürler. Peroksitlerin kendisi serbest radikal olarak görev yapar ve otokatalitik zincir reaksiyonunu başlatır. Bu da doymamış yağ asitlerinin daha fazla kaybına neden olarak şiddetli membran hasarına yol açar (49,53). Lipid hidroperoksitler yıkıldığında

biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler, ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Lipid peroksidasyonuna sekonder ürün olarak oluşan aldehitlerden en önemlisi malondialdehittir. Malondialdehit ölçümü lipid peroksidasyonu değerlendirilmesinde sık kullanılan yöntemdir. Yarılanma ömrü uzun olup membranları geçebilme özelliği vardır (56).

Lipid peroksidasyonu bir çok hastalığa ve doku hasarına neden olarak membran geçirgenliği ve mikroviskositesini ciddi etkiler. Peroksidasyonla oluşan malondialdehit, membran bileşenlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna sebep olur (57). Bu da iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir (51,52). Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu, hücre zarında önemli zedelenmeye yol açar; akışkanlığın kaybolmasına, sekretuar fonksiyonların bozulmasına ve transmembran iyon dengesizliğine sebep olur (52,58). Peroksidasyon prosesinde son ürünler aldehitler, hidrokarbon gazlar ve malondialdehidleri de içeren değişik kimyasal bileşiklerdir (56). Bu yıkım ürünleri reaksiyon sahasından uzaklaşarak, hücre ödemine neden olur, damar geçirgenliğini etkiler, inflamasyon ve kemotaksisi başlatır (46). Yine bu ürünler fosfolipaz aktivitesini değiştirerek araşidonik asit salınımını uyurabilir, böylelikle prostaglandin ve çeşitli endoperoksidazların yapımını sağlarlar (49,52).

Protein oksidasyonu, proteinlerin SOR veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir (59). Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları, enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir (44,46,60).

Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz

bağlanma olabilir. Oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanmakta ve anti DNA antikorları oluşmaktadır (60,61).

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bağ dokunun önemli bir mukopolisakkariti olan hiyaluronik asidin, inflamatuvar eklem hastalıklarında sinovial sıvıda artmış olan hidrojen peroksit ve okzoaldehidler ile parçalandığı gösterilmiştir (62).

2.13. Askorbik Asit

Altı karbonlu bir yapıya sahip olup glukoza benzer. Askorbik asit bir ketolaktondur (63). L-glukonogamalaktonoksidaz enzimi insanlarda olmadığı için askorbik asit sentezi insanlarda olmamaktadır. Askorbik asit sentezi glukozdan türevlenen glukuronik asid veya galokturonik asid üzerinden yürür. Bu metabolik yol ile glukuronik asidden askorbik asit sentezi için üç enzime gereksinim vardır. Bu enzimler karaciğer mikrozomal fraksiyonlarından izole edilmişlerdir (64).

İnsanda askorbik asit gastrointestinal sistemde enerji gerektiren sodyum bağımlı aktif transport mekanizması ile absorbe edilir. Aktif transport sistemi insanda ve koyalarda doyunluğa ulaşabilir ve alımı arttıkça absorpsiyon azalabilir. Hamster ve sıçanlarda ise askorbik asit konsantrasyona bağımlı olarak bağırsak duvarından pasif difüzyon ile geçebilmektedir (65,66).

Askorbik asit, vücudun spesifik dokularında yüksek düzeylerde bulunmaktadır. Örneğin adrenal bezler, hipofiz, timus, korpus luteum ve retina konsantrasyonları plazmadan 100 kat daha yüksek, beyin testis, tiroid, ince barsak mukozası, lenf bezleri, akciğer, karaciğer, dalak, akyuvarlar, pankreas ve tükürük bezleri ise 10–100 kat daha yüksek olduğu birçok araştırmayla belirlenmiştir (67).

Askorbik asit moleküler oksijen gerektiren karışık fonksiyonlu oksidasyon reaksiyonlarında önemli rol oynar. Hidroksilasyon yapan enzimlerin aktif bölgelerinde kofaktör benzeri rol oynar. Metal iyonlarının geçişi ile ilişkisi, indigeyici özelliği ve oksijenin serbest radikal türevleri ile

reaksiyonu biyolojik fonksiyonlarının temelini oluşturur. Ayrıca kollajen oluşumunda, yağ asidi metabolizmasında, beyin fonksiyonlarında, enfeksiyonlara karşı dirençte önemli bir maddedir (68,69). Uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye taşınmasında gerekli olan karnitinin lizinden sentezlenmesinde etkili bir vitamindir (70). Ketakolamin biyosentezinde, dopaminin norepinefrine maksimum hidroksilasyonunun sağlanmasında ve tirozin metabolizmasında askorbik asite gereksinim vardır. Ayrıca askorbik asit ve kolesterol metabolizması arasında da ilişki olduğu, kobaylarda kronik askorbik asit yetersizliğinin kolesterolün safra asitlerine katabolizmasında azalmaya neden olduğu ve kolesterolün hidroksilasyonu ile safra asitlerine dönüşümü arasında askorbik asite gereksinim olduğu belirlenmiştir (71). Ayrıca yapılan araştırmalar kolesterolden steroid hormonların biyosentezinde de vitamin C varlığının etkili olduğu gösterilmiştir (67,72,73).

Askorbik asit, iyonların vücut içinde geçişlerini azaltır. Askorbik asit eksikliği dalaktan demirin mobilizasyonuna zarar verir ve demir yükleme tedavisinde ilave askorbik asit demirin vücut depolarından mobilizasyonunu artırır. Bu nedenle askorbik asit aneminin tedavisinde de önemli bir vitamindir (70). Lökositlerdeki yüksek askorbat konsantrasyonu ve bunun enfeksiyon ve fagositoz sırasında hızla harcanması, vitaminin immun sistemde de etkili olduğunu göstermektedir (74,75).

Kollajen, proteoglikanlar ve kemik, deri, kapiller duvar ve diğer bağ dokuların hücre içi matriksinin organik bileşenlerinin sentezinde önemli rol oynar. Askorbik asit ayrıca demir ve oksijenle beraber kollajen sentezi sırasında, lizin ve prolinin hidrolizasyonu için gereklidir (76,77).

Askorbik asit, A vitamini gibi enflamatuar cevabı uyarır ve eksikliğinde konakçının enfeksiyonlara direnci düşer. Ayrıca kollajen üretiminde askorbik asit nötrofillerin fonksiyonunu (34), anjiogenezi arttırmasının (78) yanında güçlü bir antioksidan olarak görev yapar. Vitamin eksikliği olmayan hastalarda bu vitaminin ek olarak verilmesi yara iyileşmesinde hızlanmaya neden olmaz (79)

Askorbik asitin önemli biyolojik fonksiyonlarından biri de oksijen türevi olan hidroksil, singlet oksijen, süperoksit gibi serbest radikallerin harabiyetinde de rol oynamasıdır (79).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Ankara Üniversitesi Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu onayı (Toplantı No: 2013-8, Dosya No: 2013-54, Karar No: 2013-8-61) alındıktan sonra Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney hayvanları laboratuvarı'nda üretilmiş olan ve ağırlıkları 350-400 gr arasında değişen 24 adet Winstar Albino cinsi erkek ratlar çalışmaya alındı.



Resim 4. Winstar Albino Erkek Rat

Miringotomi

İntraperitoneal 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Pfizer Warner Lambert, ABD) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompun %2 , Bayer HealthCare, ABD) enjeksiyonuyla sağlanan anestezi sonrası yapılan otomikroskopik bakıda bilateral normal timpanik membrana sahip olduğu görülen 24 adet rat çalışmaya dahil edildi. Otomikroskopik muayene altında, kulak spekulumu ve steril pik (OF615R, Stainless, Almanya) kullanılarak her iki timpanik membranın arka alt kadranına 2 mm çapında standart miringotomi yapılan ratlar her grupta sekiz hayvan ve 16 kulak olacak şekilde, rastgele – randomize üç gruba ayrıldı.

Çalışma Grupları

Bilateral timpanik membranlarının arka alt kadranına pik ile miringotomi yapılan 24 adet rat üç gruba ayrıldı.

Kontrol Grubu (k) (n=14'') Bu gruptaki sekiz ratın toplam 16 kulak zarına, tanımlanan standartlarda yapılan miringotomi sonrası herhangi bir tedavi uygulanmadı.

" Onbeşinci günde yapılan otomikroskopik bakıda, bu gruba ait bir ratın her iki timpanik membranında enfeksiyon ile uyumlu görünüm izlendi. Hazırlanan bu iki spesmenin histopatolojik incelemesinde yoğun polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu ve fibrin birikimi görülmesi üzerine enfekte oldukları kabul edilerek bahsedilen rata ait her iki timpanik membran da çalışma dışı bırakıldı.

Topikal Askorbik Asit Grubu (n=12'') : Bu gruptaki sekiz ratın toplam 16 kulağına miringotomiden hemen sonra 10 mg askorbik asit emdirilmiş gelfoam (GelSpon-P® Eucare Pharmaceuticals (P) Limited, India) perforasyon üzerine gelecek şekilde yerleştirildi. Günlük tek doz şeklinde 14 kez topikal 10 mg askorbik asid (Redoxon amp 500mg/5ml, Bayer Türk Kimya Sanayi, İstanbul, Türkiye) ratların dış kulak yollarına damlatıldı.

" Çalışmanın beşinci gününde bir ratın ölmesi üzerine ve onbeşinci günde yapılan otomikroskopik bakıda, bu gruba ait bir ratın her iki timpanik membranında, enfeksiyon ile uyumlu görünüm izlenmesi ve hazırlanan spesmenin histopatolojik incelemesinde yoğun polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu ve fibrin birikimi görülmesi üzerine enfekte oldukları kabul edilerek her dört timpanik membran da çalışma dışı bırakıldı.

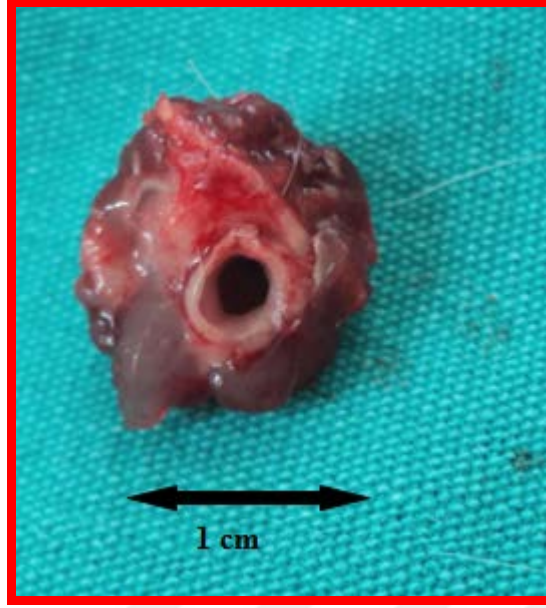
Sistemik Askorbik Asit Grubu (n=11''): Bu gruptaki bilateral miringotomi yapılan sekiz rata miringotomiden hemen sonra ve takip edilen

14 gün boyunca günlük tek doz 50 mg/kg askorbik asit intraperitoneal yolla uygulandı.

“ Çalışmanın yedinci gününde bir ratın, onuncu günde de diğer bir ratın ölmesi üzerine ve onbeşinci günde yapılan otomikroskopik bakıda, bu gruba ait bir ratın sağ timpanik membranında, enfeksiyon ile uyumlu görünüm izlenmesi ve hazırlanan spesmenin histopatolojik incelemesinde yoğun polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu ve fibrin birikimi görülmesi üzerine enfekte olduğu kabul edildi. Bunun üzerine her beş timpanik membran da çalışma dışı bırakıldı.

Miringotomi sonrasında hayvanların 14 gün boyunca günlük dozları tekrarlandı ve kontrol altında tutuldu. Standart laboratuvar koşullarında pelet yemler ile beslenen hayvanlarda su ve beslenme serbest bırakıldı. Ek kemoproflaksi uygulanmadı.

Çalışmanın 15. gününde hayvanlar yüksek doz intraperitoneal pentotal (Pental® Sodyum, İ. E. Ulagay İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye) (80 mg/kg) enjeksiyonunu takiben dekapite edildi. Dekapitasyon sonrası ratların bullaları çıkarıldı. Çıkarılmış olan bullalar açıldıktan sonra timpanik membranlar direkt görüş altına alındı. Mikroskopik görüş altında disseke edilen timpanik membranlar kendilerini çevreleyen kemik anulus ve 1-2 mm dış kulak yolu ile birlikte çıkarıldı.



Resim 5. Çıkarılan rat bullası

Histopatolojik İnceleme

Çalışmanın histopatolojik hazırlık ve değerlendirme işlemleri Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniği' nde yapıldı. Tüm histopatolojik değerlendirmeler, hangi çalışma grubuna hangi tedavinin uygulandığını bilmeyen, aynı patolog tarafından yapıldı. Her iki kulaktan hazırlanan spesmenler %10'luk formaldehit solüsyonuna koyularak histopatolojik inceleme için ayrıldı. Formol fiksasyonu sonrası, dekalsifikasyon amacıyla onbeş saat formik asitte tutulan spesmenler mikroskopik görüş altında manubrium mallei'ye dik doğrultuda, miringotomi alanından geçecek şekilde ikiye ayrıldı. Her iki parça kesit yüzü üzerine yatırılarak parafin blokları hazırlandı. Alınan beş mikrometre kalınlığındaki kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.



Resim 6. Hazırlanan spesmenlerin %10'luk formaldehit solüsyonu içerisine koyulmuş hali

Timpanik membran lamina propriasında gözlenen inflamasyon 0 - 3 puan arasında bir değer verilerek semikantitatif olarak skorlandı :

İnflamasyon yok	0
hafif inflamasyon	1
orta derecede inflamasyon	2
şiddetli inflamasyon	3

Timpanik membran total kalınlığının ölçümü için H&E boyalı kesitlerden elde edilen mikroskopik görüntüler bir kamera (Olympus BX50, Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) ile bilgisayara aktarıldı. Kullanılan büyötmeye göre kalibre edilerek, timpanik membran kalınlıkları oküler ve şaryo mikrometreler kullanılarak her bir birimin kaç mikron olduğu 10 alanda ölçöldü ve bu ölçömlerin ortalamaları timpanik membran kalınlığı olarak kabul edildi. Timpanik membranın kalınlığı mikroskobun oküler kısmına yerleştirilen okölometre (Olympus U-OCMC 10/100 XY) yardımıyla x200 büyötmeye değeriendirildi.

Hematoksilen-Eozin (H&E) boyalı kesitlerden elde edilen görüntüler kullanılarak timpanik membran lamina propriasındaki sklerotik lezyonların değerlendirilmesi yapıldı. Bulgular 0 - 2 puan arasında bir değer verilerek semikantitatif olarak skorlandı :

Miringoskleroz yok	0
Lamina propriada ayrı ayrı yerleşmiş seyrek sklerotik lezyon	1
Bir arada bulunan geniş sklerotik lezyon	2

Lamina propria (LP) ödemi ve neovaskülarizasyon oranları ise şu şekilde sınıflandı :

Yok	0
Hafif derecede	1
Orta derecede	2
Şiddetli derecede	3

İstatistiksel Analiz

İnflamasyon değerlendirme sonuçları semikantitatif skorlamaya dayalı veriler olduğu için gruplar arasında istatistiksel bir karşılaştırma yapmak amacıyla sonuçlar yok-hafif (skoru 0 ve 1 olanlar) ve orta-şiddetli (skoru 2 ve 3 olanlar) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Histopatolojik miringoskleroz dağılımı sonuçları ise yok (0), seyrek (1), sık (2) olmak üzere üç grupta değerlendirildi. Lamina propria ödemi ve neovaskülarizasyon ise yok (0), hafif (1), orta(2), şiddetli (3) olarak dört gruba ayrıldı. Gruplar arasındaki farklılığı test etmek için Ki-Kare Exact Test kullanıldı. Timpanik membran ortalama kalınlık değerleri gruplar arasında Kruskal- Wallis Test kullanılarak test edildi. $p<0.05$ istatistiksel anlamlı düzey olarak kabul edildi.

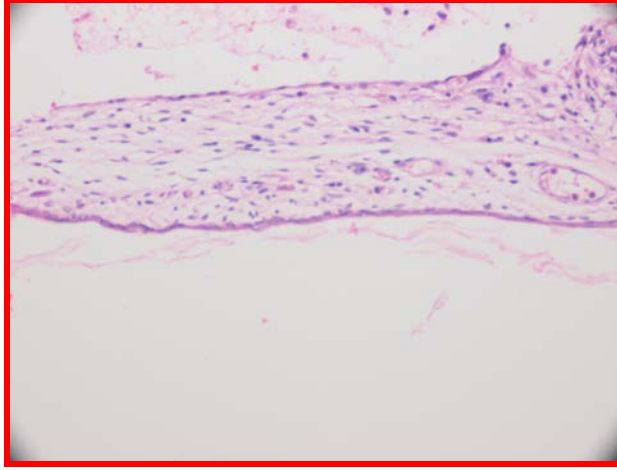
4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Değerlendirme

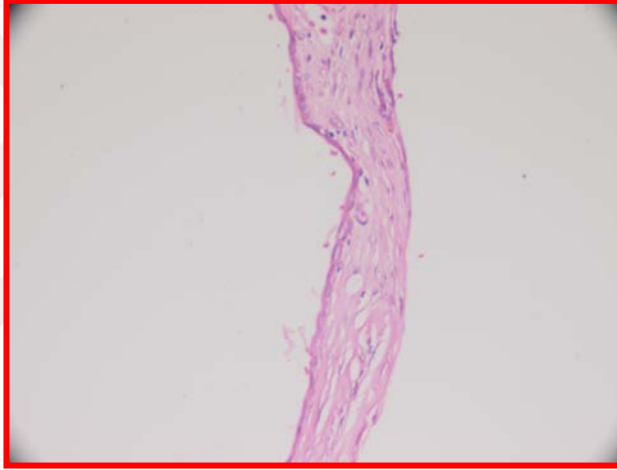
Tablo 2. Çalışmadaki tüm histopatolojik veriler

	KONTROL GRUBU					TOPIKAL ASKORBİK ASİT GRUBU					SİSTEMİK ASKORBİK ASİT GRUBU				
	İ	TK	M	Ö	N	İ	TK	M	Ö	N	İ	TK	M	Ö	N
1	0	4	0	0	0						1	3	1	1	1
2						1	1	0	1	1					
3	0	10	0	0	0						1	4	0	1	1
4	1	3	1	0	1	3	1	1	0	2	1	6	1	1	1
5	1	4	0	1	1	1	4	1	0	1	1	3	2	0	1
6	0	4	0	0	1	1	2	0	1	1					
7	1	7	2	0	1	2	4	1	0	1	2	2	2	0	0
8	1	2	1	0	1						2	4	2	1	1
9	1	6	1	0	1	1	3	1	0	0	1	3	1	1	1
10						2	3	1	1	1	1	2	2	0	0
11	0	5	1	0	1	1	3	2	1	1	2	4	1	1	1
12	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1					
13	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	3	2	0	1
14	1	6	1	0	1	0	1	0	0	0					
15	0	5	2	0	0	1	1	2	1	1	1	2	1	0	1
16	1	4	0	1	1										

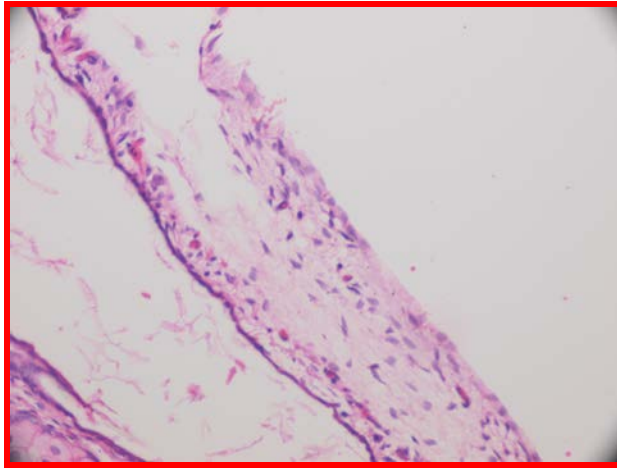
(İ: İnflamasyon, TK: Total Membran Kalınlığı, M: Miringoskleroz Yaygınlığı,
Ö: Lamina Propria Ödemi, N: Lamina Propria Neovaskülarizasyonu)



Resim 7. Topikal askorbik asit uygulanan grupta X 40 büyütmede H&E ile boyalı timpanik membran örneği



Resim 8. Sistemik askorbik asit uygulanan grupta X 40 büyütmede H&E ile boyalı timpanik membran örneği



Resim 9. Sadece parasentez uygulanan kontrol grubunda X 40 büyütmede H&E ile boyalı timpanik membran örneği

4.2. Lamina Propriada İnflamasyon

Elde edilen bulgular Tabloda sunulmuştur.

Tablo 3. Lamina propriadaki inflamasyon şiddetinin dağılımı

	Yok	Hafif	Orta	Şiddetli	Toplam
KONTROL GRUBU	6	8	0	0	14
	42,9%	57,1%	0,0%	0,0%	100,0%
SİSTEMİK ASKORBİK ASİT GRUBU	1	7	3	0	11
	9,1%	63,6%	27,3%	0,0%	100,0%
TOPIKAL ASKORBİK ASİT GRUBU	2	7	2	1	12
	16,7%	58,3%	16,7%	8,3%	100,0%
TOPLAM	9	22	5	1	37
	24,3%	59,5%	13,5%	2,7%	100,0%

Miringotomi yapıldıktan sonra tedavisiz bırakılan kontrol grubundaki 8 olguda hafif enflamasyon izlenmiştir. Miringotomi sonrası topikal askorbik asit uygulanan gruptaki 12 olgunun ikisinde inflamasyon izlenmezken yedisinde hafif, ikisinde orta ve birinde şiddetli inflamasyon tespit edilmiştir. Sistemik askorbik asit ile tedavi edilen grupta ise 11 olgunun yedisinde hafif enflamasyon, üçünde orta enflamasyon görülmüştür. Bir olguda enflamasyon görülmezken, şiddetli enflamasyona hiç rastlanmamıştır.

Lamina propria inflamasyon skorları değerlendirilirken gruplar arasında Ki-Kare Exact Test ile istatistiksel analiz yapılabilmesi için sonuçlar :

Yok - hafif (skoru 0 ve 1 olanlar) ve

Orta - ağır (skoru 2 ve 3 olanlar) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

(Tablo 4)

Tablo 4. Lamina propriadaki inflamasyon şiddetinin gruptaki dağılımı

	Yok+Hafif	Orta+Şiddetli	Toplam
KONTROL GRUBU	14	0	14
	100,0%	0,0%	100,0%
SİSTEMİK TEDAVİ GRUBU	8	3	11
	72,7%	27,3%	100,0%
TOPIKAL TEDAVİ GRUBU	9	3	12
	75,0%	25,0%	100,0%
TOTAL	31	6	37
	83,8%	16,2%	100,0%

Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; üç grupta da enflamasyonun şiddetine ilişkin dağılımlar arasında anlamlı fark olmadığı görülmüştür ($p= 0,128$, $p>0,05$).

4.3. Timpanik Membranın Kalınlığı (mikron)

Timpanik membran total kalınlığının ölçümü için H&E boyalı kesitlerden elde edilen mikroskopik görüntüler bir kamera ile bilgisayara aktarıldı ve kalibre edilerek mikron cinsinden ölçümlerin ortalamaları timpanik membran kalınlığı olarak kabul edildi. İkili gruplar arasındaki timpanik membran kalınlığı ortalamalarının farklılığını incelemek için Kruskal- Wallis testi kullanıldı. (Tablo 5)

Tablo 5. Gruplardaki total timpanik membran kalınlığı ortalamaları

TOPIKAL GRUBU	Ortalama (mikron)	2,21
	Standart Sapma	1,424
	Minimum	1
	Maximum	5
SİSTEMİK ASKORBİK ASİT GRUBU	Ortalama(mikron)	3,27
	Standart Sapma	1,191
	Minimum	2
	Maximum	6
KONTROL ASKORBİK ASİT GRUBU	Ortalama(mikron)	4,42
	Standart Sapma	2,610
	Minimum	1
	Maximum	10

Üç grupta Total kalınlık (mikron) değerleri bakımından fark vardır ($p=0,027$, $p>0,05$). Total Topikal askorbik asit uygulanan grupta kalınlık ortancası 1.5 (Min:1-Maks:5) iken Sistemik askorbik asit uygulanan grupta 3 (Min:2-Maks:6) ve Kontrol grubunda 4 (Min:1-Maks:10)'dur. Kontrol ve Topikal tedavi uygulanan gruplar arasında fark istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur. ($p=0,025$). Kontrol – Sistemik ve Sistemik –Topikal gruplarında fark yoktur (diğer iki karşılaştırma için $p>0,05$) (Kruskal – Wallis Test)

4.4. Miringoskleroz Dağılımı

Elde edilen bulgular Tablo 6 da sunulmuştur.

Tablo 6. Histopatolojik incelemeye göre miringoskleroz bulguları

	MİRİNGOSKLEROZ			
	YOK	SEYREK	SIK	TOPLAM
KONTROL GRUBU	5	5	4	14
	35,7%	35,7%	28,6%	100,0%
SİSTEMİK ASKORBİK ASİT GRUBU	1	5	5	11
	9,1%	45,5%	45,5%	100,0%
TOPIKAL ASKORBİK ASİT GRUBU	4	6	2	12
	33,3%	50,0%	16,7%	100,0%
TOPLAM	10	16	11	37
	27,0%	43,2%	29,7%	100,0%

Miringotomi sonrası tedavi verilmeyen kontrol grubundaki 14 timpanik membranın tümünde miringoskleroz gelişirken, bunlardan dördünde, bir arada bulunan, geniş sklerotik lezyonlar tespit edilmiştir. Beş timpanik membranda ise herhangi bir sklerotik plak izlenmemiştir. Topikal askorbik asit uygulanan grupta ise 12 timpanik membranın ikisinde bir arada bulunan geniş sklerotik lezyonlar görülmüştür. Altı timpanik membranda seyrek sklerotik plak varken, dört timpanik membranda herhangi bir sklerotik plak izlenmemiştir. Sistemik askorbik asit uygulanan gruba baktığımızda, beş timpanik membranda sık sklerotik plak varken, beş timpanik membranda seyrek plaklar izlenmiştir. Sistemik tedavi uygulanan sadece bir timpanik membranda sklerotik plağa rastlanmamıştır.

Gruplar arasındaki farklılığı test etmek için Ki-Kare Exact Test kullanıldı. Üç grup arasında miringosklerotik plak dağılımları arasında anlamlı fark olmadığı görüldü ($p= 0,456$, $p>0,05$).

4.5. Lamina Propria Ödemi

Elde edilen bulgular Tablo 7 de sunulmuştur.

Tablo 7. Histopatolojik incelemeye göre Lamina propria tabakasındaki ödem bulguları

	YOK	HAFİF	ORTA	ŞİDDETLİ	TOPLAM
KONTROL GRUBU	11	3	0	0	14
	78,6%	21,4%	0%	0%	100,0%
SİSTEMİK ASKORBİK ASİT GRUBU	5	6	0	0	11
	45,5%	54,5%	0%	0%	100,0%
TOPIKAL ASKORBİK ASİT GRUBU	6	6	0	0	12
	50,0%	50,0%	0%	0%	100,0%
TOPLAM	22	15	0	0	37
	59,5%	40,5%	0%	0%	100,0%

Her üç grupta da lamina propriada orta ve şiddetli ödem bulgusuna rastlanmadı. Gruplar arasındaki farklılığı test etmek için Ki-Kare Exact Test kullanıldı. Üç grup arasında lamina propria ödemi açısından anlamlı fark olmadığı görüldü ($p= 0,215$, $p>0,05$).

4.6. Lamina Propria Neovaskülarizasyonu

Elde edilen bulgular Tablo 8 de sunulmuştur.

Tablo 8. Histopatolojik incelemeye göre lamina propria tabakasındaki yeni damarsal oluşum bulguları

	YOK	HAFİF	ORTA	ŞİDDETLİ	TOPLAM
KONTROL GRUBU	5	9	0	0	14
	35,7%	64,3%	0,0%	0,0%	100,0%
SİSTEMİK ASKORBİK ASİT GRUBU	2	9	0	0	11
	18,2%	81,8%	0,0%	0,0%	100,0%
TOPIKAL ASKORBİK ASİT GRUBU	3	8	1	0	12
	25,0%	66,7%	8,3%	0,0%	100,0%
TOPLAM	10	26	1	0	37
	27,0%	70,3%	2,7%	0,0%	100,0%

Kontrol grubunda dokuz timpanik membranda hafif derecede yeni damarsal oluşumlar varken, beş timpanik membranda yeni damarsal oluşumlara rastlanmadı. Sistemik tedavi uygulanan grupta iki timpanik membranda hiç yeni damarsal yapı yokken, dokuz timpanik membranda hafif derecede damarsal oluşumlar izlendi. Topikal tedavi uygulanan grupta ise sekiz timpanik membranda hafif derecede, bir timpanik membranda orta derecede yeni damarsal oluşumlar izlendi. Gruplar arasındaki farklılığı test etmek için Ki-Kare Exact Test kullanıldı. Üç grup arasında lamina propria tabakasında yeni damar oluşumu açısından anlamlı fark olmadığı görüldü ($p= 0,583$, $p>0,05$).

5. TARTIŞMA

Çalışmanın amacı, sistemik ve lokal askorbik asit kullanımının deneysel hayvan modelinde travmatik kulak zarı iyileşmesi üzerine ve miringosklerozun önlenmesine yönelik muhtemel etkilerinin araştırılması ve karşılaştırılmasıdır.

Miringoskleoz, timpanik membranın lamina propria tabakasındaki kollajenik yapının kalsifiye ve hiyalinize olması ile karakterize bir durumdur. Genellikle travmatik timpanik membran yırtılmaları ya da EOM tedavisinde parasentez yapılması veya orta kulak havalanmasını dengelemek amacıyla yapılan ventilasyon tüpü uygulaması sonrası ortaya çıkar (80,81).

Otoskopik olarak miringoskleroz timpanik membran üzerinde yerleşik farklı şekil ve boyutta beyaz plaklar şeklinde görülür. Histopatolojik olarak, sklerotik plakların lamina propria tabakasındaki kalsiyum fosfat içerikli mineralize agregatların düzensiz kollajen lifleri arasında yerleşmiş olduğu görülmektedir (82,83). Sklerotik lezyonların mikroskopik incelemesinde plak yapısı ve lokalizasyonu açısından, insanlar ve sıçanlar arasında bir farkın olmadığı göze çarpar (84,85,86). Bu nedenle miringoskleroz oluşumunu açıklamaya yönelik birçok hayvan çalışması yapılmıştır.

Lokalizasyon açısından değerlendirildiğinde plakların en sık yerleşim yeri timpanik membrandır. Ayrıca kemikçik zincir, orta kulak mukozası, iç kulak yapıları da sklerotik plak oluşumlarından etkilenebilmektedir. Sklerotik plakların sınırlı olduğu vakalarda herhangi bir semptomla rastlanmazken, daha ileri vakalarda işitme kayıplarına rastlanabilir (7,19,87). İleri derecede etkilenecek vakalarda kalıcı tedaviyi sağlamak oldukça güçtür (19,88). Cerrahi sonrası sık rekürrenslerin olması ve kalıcı sonuçların elde edilememesi, tedaviden çok skleroz oluşumunu önlemeyi amaçlayan çalışmaların yapılmasına neden olmuştur (88,89). Bu nedenle yapılan birçok araştırmada miringoskleroza neden olan etkenler araştırılmış ve farklı tedaviler denenmiştir. Ancak yapılan çalışmalarda miringoskleroz nedenleri ve oluşum süreçleri açıklığa kavuşturulamamıştır. Öne çıkan nedenler incelendiğinde enfeksiyon ilk sırada yer alırken travma, parasentez uygulaması, ventilasyon

tüpü yerleştirilmesi, alerjik durumlar, bakteriyel ürünler, tuba östaki patolojileri, kalıtsal yatkınlık sayılmaktadır (2,8,9).

Miringoskleroz gelişimini açıklayan birçok çalışma yapılmıştır. Tos ve ark. (6) yaptıkları çalışmada miringosklerozun patoloji saptanmayan bir timpanik membranda oluşmadığı, parasentez yapıp ventilasyon tüpü yerleştirilen bir membranda zar hareketinin kısıtlanması, hiyalinize ve kalsifiye bir kollajen tabakanın oluşmasına neden olduğunu savunmuşlardır. Ayrıca sklerotik plakların genellikle anulusa yakın bölgelerde yerleştiği, zarın santralinde ise daha az olduğunu vurgulamışlardır. Bu durumu ise timpanik membran hareketinin periferde daha az, santral bölgelerde ise daha fazla olmasına bağlamışlardır. Yapılan diğer bir çalışmada ise parasentez uygulanıp ventilasyon tüpü takılan vakalarda oluşan kanamanın skleroz gelişimine zemin hazırladığı vurgulanmıştır (90,91). Farklı bir çalışma ise enfeksiyon yada travma gibi nedenlerle dokuda oluşan lokalize aşırı duyarlılık reaksiyonunun skleroz gelişimine yol açtığını savunmuşlardır (9).

Mattsson ve arkadaşları ise parasentez uyguladıkları sıçanları kontrol grubu, sistemik ve topikal steroid tedavi grubu olarak üç gruba ayırmışlardır. Kontrol grubuna herhangi bir tedavi verilmemiştir. Her iki grupta da kontrol grubuna göre timpanik membranda daha az enflamatuvar reaksiyon görmüşlerdir. Kontrol grubunda lamina propria tabakasında ödemin daha fazla olduğu ve daha sık sklerotik plakların olduğu göze çarpmıştır. Sonuç olarak enflamatuvar sürecin miringoskleroz gelişimine neden olabileceği vurgulanmıştır (81).

Üzerinde durulan diğer bir konu ise serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu irreversible doku hasarının miringoskleroz gelişiminin en önemli nedeni olduğudur (7,18,13,10). İnsan metabolizmasında oksijenin büyük bir kısmı mitokondri içindeki sitokrom oksidaz enzim kompleksi ile suya indirgenir. Ancak bazen tam tersine serbest radikallere dönüşebilmektedir. Organizmada birçok antioksidan sistem bu serbest radikallerin zararlı etkilerini baskılar. Ancak bu sistemlerin belirli bir kapasitesi vardır. Kapasitenin üzerinde oluşabilecek serbest radikaller dokulara zarar verir. (92,93).

Parasentez sonrası, normalde % 5 ile 10 arasında değişen orta kulak oksijen basıncı ortalama %20 olan dış kulak yolu basıncına eşit olur. Böylece orta kulakta hiperoksik bir ortam oluşur. Bu hiperoksik ortam nedeniyle oluşan serbest oksijen radikalleri enflamasyon ve doku hasarı oluşturur (82,94,95).

Yapılan bir çalışmada parasentez uygulanan ratlar farklı oksijen basınçlarında ve normal hava koşullarında izledikten sonra mikroskopik ve histopatolojik incelemişlerdir. Bütün hiperoksik gruplarda skleroz gelişimi izlenmiştir. Bu çalışma ile artmış oksijen basıncının miringosklerozu arttırdığı savunulmaktadır (11). Yüksek O₂ konsantrasyonunda tutulan ratlarda, normal atmosfer basıncında tutulanlara göre daha fazla miringoskleroz geliştiği tespit edilmiştir (96).

Serbest oksijen radikalleri antioksidan maddeler tarafından etkisiz hale getirilebilmektedir. Literatüre baktığımızda E vitamini, askorbik asit, selenyum, N-asetil sistein ve L-karnitin gibi maddelerin uygulanması ile miringoskleroz gelişiminin engellenebileceği gösterilmiştir (7,18,13,10).

Yapılan bir çalışmada perfore timpanik membranlara deneysel olarak sistemik çinko aspartat uygulanmış ve miringoskleroz gelişimi açısından değerlendirilmiş. Miringosklerotik bulgulara göre çinko aspartat tedavisi miringosklerozun önlenmesi veya azaltılmasında yararlı etkilere sahip olduğu sonucuna varılmıştır (96). Yapılan diğer bir çalışmada ise deneysel olarak sistemik melatonin uygulanmış ve tedavide pozitif sonuçlar elde edilmiştir (97).

Bu amaçla kullanılabilecek diğer bir madde ise suda eriyebilen bir vitamin olan askorbik asittir. Askorbik asit güçlü bir indirgeyici ajandır ve aynı zamanda antioksidandır. (46).

Askorbik asit, folik asit, karbonhidrat ve tirozin metabolizması, lipid ve protein sentezinde rol oynar (98). Askorbik asit, bağ dokusu sentezinde önemli fonksiyonlara sahiptir. Lizin, prolin ve askorbik asit yara iyileşmesinde önemli yere sahiptir. (98,99). Askorbik asit lizin ve prolin hidroksilasyonu için gereklidir (98). Keratinositlerden tip 1 ve 3 kollajen sentezini in vitro artırdığı için yara iyileşmesinde önemli yer tutar (16).

Askorbik asidin kulak zarındaki iyileşme üzerine olan etkisinin birkaç mekanizma ile olduğu öne sürülmektedir. Travmatik kulak zarına uygulanan askorbik asidin antioksidan etki ile yara iyileşmesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (18). Diğer bir etki mekanizması ise yara dokusundaki fazla demir iyonlarının iyileşmeyi negatif yönde etkilemesidir (100). Askorbik asit uygulaması dokudaki demir iyonlarının azalmasına neden olmakta ve iyileşmeye olumlu katkıda bulunmaktadır (101).

Askorbik asit plazmada ilk antioksidan savunma sistemini oluşturur. Ateroskleroza karşı LDL kolesterolün oksidasyonunu önler. Süperoksit, nitrojen oksit türleri ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onların temizlenmesinde rol oynar (46,102,103). Askorbik asit ayrıca tokoferoksil radikalini tokoferole dönüştürür. Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyen bir ajandır. Bu şekilde demiri Fenton reaksiyonuna girmeye uygun hale getirir. Böylece plazma düzeyleri düşük olduğu zaman süperoksit üretimine katkıda bulunur (18,104,105).

Yapılan bir çalışmada miringotomi yapıldıktan sonra hiperoksik ortamda tutulan sıçanlara uygulanan süperoksit dismutaz gibi serbest oksijen radikali engelleyici maddelerin miringoskleroz oluşumunu önlediği gösterilmiştir (95). Bu maddeler süperoksiti etkisiz hale getirir ve hücreyi irreversible hasardan korur. Hiperoksik ortamda oluşan süperoksit radikalinin, akut inflamasyonda oluşan NO ile reaksiyona girmesi sonucunda peroksinitrit oluşmaktadır. NO etkilerini peroksinitrit üzerinden gösterir. Süperoksit dismutaz süperoksit radikalini engeller. Böylece peroksinitrit oluşumu engellenmiş olur. Enflamasyon sırasında oluşan peroksinitritin oluşturduğu doku hasarı fibrozis ile iyileşir. Bu süreçte timpanik membranın lamina propriasında fibroblastik aktivite artışı, düzensiz kollajen sentezi ve hiyalinizasyon oluşur. Bu süreçten sonra oluşan kalsifikasyon sklerotik plak oluşumunu tamamlar.

Literatür incelendiğinde üç farklı NO düzeyleri ile karşılaşılır. İndüklenmiş NO patolojik süreçlerde ortaya çıkarken, endotelial ve nöral NO fizyolojik olarak salgılanmaktadır. Ancak enflamatuvar olaylar sırasında indüklenmiş NO yaklaşık bin kat daha fazla salgılanmaktadır (103,106).

Biz, çalışmamızda peroksinitrit oluşumunu askorbik asit kullanarak önlemeyi tercih ettik. Askorbik asit ile süperoksit oluşumunu baskılamayı ve peroksinitrit oluşumunu önlemeyi hedefledik. Bu şekilde, peroksinitritin oluşturduğu doku hasarını önleyerek miringoskleroz gelişimini baskılamayı amaçladık.

Çalışmamızda her üç grup arasında da sklerotik plakların yaygınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Miringotomi sonrası topikal ve sistemik olarak uygulanan askorbik asidin sklerotik plak oluşumunu ve yaygınlığını anlamlı derecede azaltmadığını gördük. Ancak total timpanik membran kalınlığının topikal tedavi olarak uygulanan grupta sistemik ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığını düşünmekteyiz ($p= 0,027$, $p>0,05$).

Askorbik asit ve diğer antioksidan özelliği olan vitaminler vasküler endotel hücrelerinden endotelial NO düzeyini artırarak vasküler endotelial fonksiyonları düzenlerler (102). İndüklenmiş NO yara iyileşmesinin inflamasyon fazında yüksek miktarda ortaya çıkar ve inflamasyon fazından sonra ise aktivitesi azalarak kaybolmaktadır. Biz çalışmamızda askorbik asit kullanarak indüklenmiş NO inhibisyonu ile aşırı NO sentezini önleyerek timpanik membran lamina propriasındaki inflamatuvar cevabı azaltmayı planladık. Çalışma sonuçlarına baktığımızda topikal ve sistemik askorbik asit kullanımının kontrol grubuna oranla enflamasyon üzerine anlamlı etkisinin olmadığını gördük.

Ayrıca yara iyileşmesi üzerine olan etkilerinden dolayı askorbik asit tercih nedenimizdi. Askorbik asidin kulak zarında iyileşme üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada sıçan kulak zarında deneysel yolla oluşturulan perforasyona topikal askorbik asit uygulanmış ve kontrol grubuna göre daha az miringoskleroz gelişimi gösterilmiştir. Kulak zarına uygulanan askorbik asidin antioksidan etki ile yara iyileşmesine olumlu katkı yaptığı öne sürülmüştür.(94)

Literatür incelendiğinde travmatik kulak zarı ve miringoskleroz gelişimi üzerine topikal askorbik asit kullanımına ilişkin çalışmalar varken sistemik askorbik asit kullanımının miringoskleroz üzerine etkisini inceleyen hiçbir

çalışmaya rastlamadık. Yaptığımız çalışmada sistemik ve topikal askorbik asid kullanımının travmatik kulak zarı iyileşmesi ve mirigioskleroz üzerine etkilerinin karşılaştırılmasını amaçladık.

Literatüre bakıldığında topikal askorbik asid kullanım dozu ve tedavi süresi ile ilgili iki çalışma mevcuttu (18, 107). Ancak kulak zarı üzerine sistemik askorbik asid kullanım dozuna ilişkin hiçbir çalışmaya rastlamadık. Askorbik asidin antioksidan etkinliği ve yara iyileşmesi üzerine olan bir çok çalışmada farklı dozlar kullanılmıştır (108,109,110,111). Biz çalışmamızda 10 mg topikal askorbik asid emdirilmiş spongostan ve 50 mg/kg intraperitoneal askorbik asid kullandık. Literatürde farklı doz ve kullanım süresinin tedaviye olan katkısını gösteren herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Doz ve kullanım süresine bağlı yapılacak çalışmalar optimum tedavi etkinliği için yol gösterici olabilir.

Ayrıca, askorbik asit yara dokusunda nitrik oksit (NO) benzeri etki göstererek vazodilatasyonu ve damarlanmayı da artırmaktadır (112). Spratley ve ark.(18) askorbik asit uygulanan perfore kulak zarlarında damarlanma artışı göstermişlerdir. Travmatik kulak zarı iyileşmesinde yeni damarlanmalar epitelyal ve fibroz tabakaların gelişimi için gereklidir (106). Biz, yaptığımız çalışmada ise topikal ve sistemik askorbik asid kullanımının timpanik membran lamina propria tabakasında neovaskülarizasyon ve ödem oluşumuna etkisinin olmadığını gördük.

Daha öncede belirttiğimiz gibi topikal ve sistemik askorbik asid kullanımının travmatik kulak zarı perforasyonu iyileşmesi ve miringioskleroz üzerine etkinliğinin sınırlı olduğunu gördük. Ancak topikal askorbik asit tedavisinin zar kalınlığı üzerine etkisinin anlamlı olabileceğini düşünüyoruz. Askorbik asitin yara iyileşmesi üzerine yapılan çeşitli çalışmaların olmasına rağmen timpanik membran üzerine çalışmaların az olması ve sistemik askorbik asit kullanımına ilişkin çalışmaların olmaması daha fazla araştırma gerektirdiğini düşündürmektedir. Ayrıca askorbik asit dozunun değiştirilmesiyle yapılabilecek çalışmaların sonuçları etkileyebileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

Topikal, sistemik ve kontrol grupları arasında enflamasyonun şiddetine ilişkin dağılımlar arasında anlamlı fark olmadığı görülmüştür ($p= 0,128$, $p>0,05$). Total kalınlık ortalamaları açısından kontrol ve topikal tedavi uygulanan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur. ($p=0,025$). Kontrol – Sistemik ve Sistemik –Topikal gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (diğer iki karşılaştırma için $p>0,05$). Her üç grup arasında miringosklerotik plakların dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü ($p= 0,456$, $p>0,05$). Her üç grupta da lamina propriada orta ve şiddetli ödem bulgusuna rastlanmadı. Üç grup arasında lamina propria ödemi açısından anlamlı fark olmadığı görüldü ($p= 0,215$, $p>0,05$). Timpanik membran lamina propria tabakasındaki yeni damar oluşumu açısından üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü ($p= 0,583$, $p>0,05$).

Elde edilen sonuçlar sistemik askorbik asitin travmatik kulak zarı perforasyonları ve miringoskleroz üzerine etkinliğinin kontrol grubu ve topikal tedavi uygulanan grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermiştir. Topikal askorbik asit tedavisinin ise sklerotik plak oluşumunu engellemediği, ancak total kulak zarı kalınlığını diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir. Ancak askorbik asit çalışmalarının literatürde sınırlı olması, doz bağımlı çalışmaların yapılmamış olması daha fazla çalışma yapılması gerektiğini göstermektedir.

7. ÖZET

Timpanik membran (TM) perforasyonu klinik olarak sık görülen bir durumdur. Tahmini insidansı %1'in altında olmasına rağmen gerçek insidansın daha yüksek olduğu bilinmektedir. Ayrıca parasentez ve ventilasyon tüpü uygulamaları çocukluk yaş grubunda uygulanan en sık cerrahi girişimlerden biridir ve medikal tedavinin yetersiz olduğu efüzyonlu otitis media olgularında kullanılmaktadır. Uygulanan bu cerrahi prosedürün erken ve geç dönem çeşitli komplikasyonları mevcuttur. En sık karşılaşılan uzun dönem komplikasyon sklerotik plak oluşumudur. Sklerotik plak oluşumu timpanik membranın ve orta kulağın bağ dokusunu etkileyen dejeneratif bir patolojidir. Timpanik membran lamina propria tabakasındaki hyalinizasyon ve kollajen lif artışı ile karakterizedir. Ayrıca bu oluşum üzerine kalsiyum ve fosfor birikimi kristalizasyona ve skleroza neden olur. Enfeksiyon, travma, parasentez, ventilasyon tüpü uygulamaları, tuba östaki patolojileri, kalıtsal patolojiler ve kolesteatom sebepler arasında sayılmaktadır. Parasentez sonrası oluşan hiperoksik durumun ve oluşan serbest oksijen radikallerinin (SOR) skleroz gelişimi üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Timpanik membranda zedelenmeye neden olan travma yada parasentez sonrası skleroz oluşumunu önlemeye yönelik çeşitli antioksidan maddeler denenmiş ve oluşan serbest oksijen radikallerinin kantitatif ölçümü yapılarak skleroz gelişiminin azaldığı gösterilmiştir. Askorbik asit güçlü bir redüktan ajan ve antioksidandır. Yaptığımız çalışmada ise miringotomi uygulanan sıçanların çıkarılan kulak zarlarının histopatolojik incelemesi yapılarak, topikal ve sistemik askorbik asit kullanımının skleroz gelişimi üzerine etkisinin kıyaslanması amaçlanmıştır.

Çalışmaya ağırlıkları 350-400 gr arasında değişen 24 adet Winstar Albino cinsi erkek ratlar alındı. Bilateral timpanik membranlarının arka alt kadranına pik ile miringotomi yapılan ratlar üç gruba ayrıldı. İlk gruba tanımlanan standartlarda yapılan miringotomi sonrası herhangi bir tedavi uygulanmadı ve kontrol grubu olarak belirlendi. İkinci gruptaki ratlara miringotomiden hemen sonra 10 mg askorbik asit emdirilmiş gelfoam perforasyon üzerine gelecek şekilde yerleştirildi. Günlük tek doz şeklinde 14

kez topikal 10 mg askorbik asid dış kulak yollarına damlatıldı ve topikal grup olarak belirlendi. Üçüncü gruba ise miringotomiden hemen sonra ve takip edilen 14 gün boyunca günlük tek doz 50 mg/kg askorbik asit intraperitoneal yolla uygulandı ve sistemik grup olarak belirlendi. Çalışmanın 15. gününde hayvanlar dekapite edildi. Dekapitasyon sonrası ratların bullaları çıkarıldı. Çıkarılmış olan bullalar açıldıktan sonra timpanik membranlar direkt görüş altına alındı. Mikroskopik görüş altında diseke edilen timpanik membranlar kendilerini çevreleyen kemik anulus ve 1-2 mm dış kulak yolu ile birlikte çıkarıldı. Her iki kulaktan hazırlanan spesmenler histopatolojik inceleme için ayrıldı. Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Çıkarılan patolojik spesmenler timpanik membrandaki enflamasyon, total zar kalınlığı, miringosklerotik plak yaygınlığı, lamina propria tabakasındaki ödem ve neovaskülarizasyon açısından değerlendirildi. Timpanik membran ortalama kalınlık değerleri gruplar arasında Kruskal-Wallis Test, diğer parametrelerde gruplar arasındaki farklılığı test etmek için Ki-Kare Exact Test kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel anlamlı düzey olarak kabul edildi.

Çalışmamızda sonuç olarak topikal ve sistemik askorbik asid kullanımının enflamasyon yaygınlığı, plakların dağılım genişliği, lamina propria tabakasındaki ödem ve neovaskülarizasyon açısından etkili olmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak topikal askorbik asid kullanımının total zar kalınlığı üzerine anlamlı derecede etkili olduğu gösterilmiştir. Sistemik askorbik asid kullanımının kontrol ve topikal grup ile karşılaştırıldığında etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Askorbik Asit, Miringoskleroz, Timpanoskleroz, Timpanik membran

SUMMARY

Tympanic membrane (TM) perforation is a common clinical condition. Although the estimated incidence is less than 1% , it is known that the actual incidence is higher. Paracentesis and ventilation tube applications are the one of the most common surgical procedures in the pediatric age group. They are used in patients with otitis media with effusion when medical treatment is insufficient. This surgical procedure may have a variety of early and late complications. The most common long-term complication is sclerotic plaque formation. Sclerotic plaque formation is a degenerative pathology that affects the connective tissue of the tympanic membrane and middle ear. It is characterized by the increase of collagen fibers and hyalinization of lamina propria layer of tympanic membrane . In addition, deposition of calcium and phosphorus to this formation leads to crystallization and sclerosis. Infection, trauma, paracentesis, ventilation tube applications, eustachian tubal pathology, genetic diseases and cholesteatoma are considered some the reasons of myringosclerosis and tympanosclerosis. Hyperoxic situation and reactive oxygen species (ROS) formed after paracentesis is known to affect the development of sclerosis. Various antioxidant substances are tested to prevent the formation of sclerosis after tympanic membrane injury by trauma or paracentesis. It is shown by making quantitative measurement of reactive oxygen species that antioxidant substances can reduce the development of sclerosis. Ascorbic acid is a strong reductant and antioxidant agent. In our study, histopathological examination of the tympanic membranes were extracted from rats treated with myringotomy and we aimed to compare the effect of using ascorbic acid topically and systemically.

24 Wistar Albino male rats whose weights ranging from 350 to 400 g were in the study. They are divided into three groups. We applied myringotomy to their bilateral tympanic membranes in the back of lower quadrant. First group that did not take any treatment after myringotomy is defined as control group. In second group, gelfoam impregnated with 10 mg ascorbic acid were placed to perforation immediately after myringotomy. 10

mg ascorbic acid was dropped to the external auditory pathways as a single dose daily and continued 14 days to second group. The third group was determined as systemic group. They were applied daily single dose of 50 mg / kg of ascorbic acid by intraperitoneal pathway immediately after miringotomi and continued 14 days. The animals were decapitated on 15th day of the study. Bullae of rats were removed after decapitation. After opening of removed bullae, tympanic membranes were taken to under direct vision. The tympanic membranes were dissected under microscopic vision were removed with the surrounding bone annulus and with 1-2 mm of the outer ear canal. Specimens of both ears were prepared for histopathological examination. They were examined under a light microscope after staining with hematoxylin and eosin (H & E). Inflammation, the total thickness of the membrane, amount of miringosklerotic plaque, edema of the layer lamina propria and neovascularization were evaluated in pathological specimens obtained from the tympanic membrane. We used The Kruskal-Wallis test for difference in average thickness of the tympanic membrane between groups and Chi-square test for other parameters. $p < 0.05$ was considered statistically significant level.

In our study, we concluded that the use of ascorbic acid topical or systemic pathway is ineffective in terms of inflammation, plaque diffusiveness, neovascularization and edema in lamina propria layer. But it is shown that topical ascorbic acid have a significant effect on the total membrane thickness. Systemic ascorbic acid had no effect.

Keywords: Ascorbic Acid, myringosclerosis, tympanosclerosis, tympanic membrane

8. KAYNAKLAR

1. Cohen D, Tamir D. The prevalence of middle ear pathologies in Jerusalem school children. *Am J Otol*. 1989 Nov;10(6):456-9.
2. Riley DN, Herberger S, McBride G, Law K. Myringotomy and ventilation tube insertion:A ten year follow up. *J Laryngol Otol* 1997;111:257-261.
3. Bluestone CD.Role of surgery for otitis media in the ear of resistant bacteria. *Pediatr infect Dis J* 1998;17:1090–8.
4. Mandel EM, Rockette HE, Bluestone CD, Paradise JL. RJ.Efficacy of myringotomy with and without tympanostomy tubes for chronic otitis media with effusion. *Pediatr Infect Dis J* 1992;11:270–7.
5. Tos M, Stangerup SE. Hearing loss in tympanosclerosis caused by grommets. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1989;115:931-935.
6. Tos M, Bonding P, Paulsen G. Tympanosclerosis of the drum in secretory otitis media after insertion of grommets: *J Laryngol Otol* 1983;97:489-496.
7. Akbas Y, Pata YS, Gorur K, Polat G, Polat A, Ozcan C, Unal M. The effect of L-carnitine on the prevention of experimentally induced myringosclerosis in rats. *Hear Res*. 2003;184:107-12.
8. Bhaya MH, Schachern PA, Morizono T, Paparella MM. Pathogenesis of tympanosclerosis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993;109:413-20.
9. Schiff M, Poliquin JF, Catanzaro A, Ryan AF. Tympanosclerosis: A theory of pathogenesis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1980;89:1-15.
10. Polat S, Öztürk Ö,Üneri C, Yüksel M, Haklar G, Bozkurt S, Küllü S. Determination of reactive oxygen species in myringotomized tympanic membranes: Effect of vitamin E treatment. *The Laryngoscope* 114(4):2004:720-725.
11. Oneri C, Sarı M, Akboga J, Yüksel M. Vitamin E-coated tympanostomy tube insertion decreases the quantity of free radicals in tympanic membrane. *The Laryngoscope* 116(1): 2006 :140-143.

12. Mattsson C, Magnuson K, Hellström S. Myringosclerosis caused by increased oxygen concentration in traumatized tympanic membranes: *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104:1995:114-120.
13. Ozcan C, Görür K, Cinel L. The inhibitory effect of topical n-acetylcysteine application on myringosclerosis in perforated rat tympanic membrane. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002; 63:179-184.
14. Cinar F, Ugur MB, Uzun L: Could radiofrequency myringotomy be an alternative to incisional myringotomy? *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2008;72(10):1493-6.
15. inclair AJ, Barnet AH, Lunec J: Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Br J Hosp Med* 43:334-344, 1990.
16. Saika S, Uenoyama K, Hiroi K, Tanioka H, Takase K, Hikita M. Ascorbic acid phosphate ester and wound healing in rabbit corneal alkali burns: epithelial basement membrane and stroma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;231:221-7.
17. Collins CK, Lewis AE, Ringsdorf WM Jr, Cheraskin E. Effect of ascorbic acid on oral healing in guinea pigs. *Int Z Vitaminforsch* 1967;37:492-5.
18. Spratley JE, Hellstrom SO, Mattsson CK, Pais-Clemente M. Topical ascorbic acid reduces myringosclerosis in perforated tympanic membranes. A study in the rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001;110: 585- 91.
19. Akyıldız NA. Kulak Hastalıkları Ve Mikrocerrahisi. Cilt 1, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 1998.
20. Judkins RF, Li H. Surgical anatomy of the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 117:438-47.
21. Hebel R, Stromberg MW. Anatomy of the laboratory rat. Baltimore. Williams&Wilkins Co; 1976.
22. Stenfeldt K, Johansson C, Hellström S. The collagen structure of the tympanic membrane: Collagen types I, II, and III in the healthy tympanic

membrane, during healing of a perforation, and during infection. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2006;132:293-8.

23. Schmidt SH, Hellström S. Tympanic membrane structure-new views: a comparative study. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 1991;53:32-6.
24. Güneri EA, Tekin S, Yılmaz O, Ozkara E, et al. The effects of hyalunoric acid, epidermal growth factor and mitomycin in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. Otol Neurotol 2003;24:371-6.
25. Oktay MF, Cureoglu S, Schachern PA, Paparella MM, et al. Tympanic membrane changes in central tympanic membrane perforations. Am J Otolaryngol 2005;26:393- 7.
26. Johnson AP, Smallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. Acta Otolaryngol (Stockh) 1990;109:406-15.
27. Spratley J, Hellström S, Eriksson PO, Pais-Clemente M. Early structural tympanic membrane reactions to myringotomy: a study in an acute otitis media model. Acta Otolaryngol 2002;122:479-87.
28. Magnuson K, Hermansson A, Hellström S. Healing of tympanic membrane after myringotomy during streptococcus pneumoniae otitis media. Ann Otol Rhinol Laryngol 1996;105:397-404.
29. Wang WQ, Wang ZM, Chi FL. Spontaneous healing of various tympanic membrane perforations in the rat. Acta Otolaryngol 2004;124:1141-4.
30. Yamaguchi Y, Yoshikawa K. Cutaneous wound healing: an update. J Dermatol 2001;28:521-34
31. Mondain M, Ryan A. Histological study of the healing of traumatic tympanic membrane perforation after basic fibroblast growth factor application. Laryngoscope 1993;103:312-8.

32. Mattsson C, Johansson C, Hellström S. Myringosclerosis develops within 9 hours of myringotomy. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1999;61:31-6.
33. Santos PF, Leal MC, Peixoto C, Caldas NS, et al. Otomicroscopic and histologic findings of induced myringosclerosis in rats: a critical study of an experimental model. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)* 2005;71:668-74.
34. Dequine C, Pulec JL. Tympanosclerosis with squamous epithelium in the tympanium. *ENT Journal*, 1999;78(6): 259-264.
35. Makishima K, Toriya Y, _noue S, Nakashima T, Igarashi Y. Clinicopathologic Studies in tympanosclerosis. *The American Journal of Otology*.1982.4:12. 260-264.
36. Mirko Tos. Pathogenesis of tympanosclerosis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993;4:13-20.
37. Baylor C. The Pathology of Tympanosclerosis from the Department of ORL, 1984;16-33: 233-243.
38. Russell JD, Giles JJ. Tympanosclerosis in the Rat Tympanic Membrane. *Laryngoscope*, 2002;112(9):1663-1666.
39. McKee GJ, Kerr AG. Tympanosclerosis: a scanning electron microscopic study. *Clin Otolaryngol* 1989;14(1):11-16.
40. Dursun G, Acar A, Turgay M, Cangüner M. Human leucocyte antigens in tympanosclerosis. *Clin Otolaryngol* 1997; 22(1): 62-64.
41. Bertossi M, Iurati S. An Ultrastructural study of the calcification process in tympanosclerosis. *J. Submicrosc. Cytol.* 1981;13(2): 283-289.
42. Schiff M. Tympanosclerosis: *Ann Otol. Rhinol. Laryngol* 1983;92(6):85-88.
43. Gan RZ, Wang X. Middle Ear effusions and structure of the TM. *Laryngoscope* 2001;111(2): 90-95.

44. Deby C., Pincemail J.: Oxygen toxicity, free radicals and defense mechanisms. In: Rökan (Ginkgo Biloba). Recent result in pharmacology and clinic. Ed: Fünfgeld EW. Springer- Verlag, Berlin pp:57-70, 1988.
45. Murray RK. et al.: Harper's Biochemistry 13:110-5, 23 th ed. Appleton and Lange, 1990.
46. Akkuş İ.: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. s. 3-10, 1. Baskı, Mimoza Yayınları, 1995.
47. Cheeseman KH., Slater TF.: An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull. 49(3):481-93, Review 1993.
48. Dormandy TL. An approach to free radicals. Lancet 1983;29:1010-1014.
49. Ward PA, Warren JS, Johnson KJ. Oxygen radicals, inflammation, and tissue injury. Free Radical Biology & Medicine 1988; 5: 403-408.
50. Smith TL, Correa AJ, Kuo T, Reinisch L. Radiofrequency tissue ablation of the inferior turbinates using a thermocouple feedback electrode. Laryngoscope 1999;109:1760–1765.
51. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine: 1. Chemical nature and biologic reactions. Mayo Clin Proc 1988;63:381-389.
52. Salin ML, McCord JM. Free radicals and inflammation: protection of phagocytosing leukocytes by superoxide dismutase. J Clin Invest 1975; 56: 1319-1323.
53. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/ antioxidant balance. Clin Biochem 1993; 26: 351-357.
54. Scott Thomas, Brewer Marry. Concise encyclopedia of biochemistry. New York: de Gruyter, 1983: 505-6.
55. Cooke MS., Evans MD., Dizdaroglu M., Lunec J.: Oxidative DNA damage mechanisms, mutation, and disease. FASEB J. 17(10):1195-214, Review 2003.

56. Dahle LK, Hill EG, Holman RT. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch Biochem Biophys* 1962; 98: 253-261.
57. Aust SD, Svingen BA. The role of iron in enzymatic lipid peroxidation. In: Pryor WA, *Free Radicals in Biology*, New York: Academic; 1982.
58. Van Dyke K, Castranova V. *Cellular Chemiluminescence*. CRC Press, 1987:1-67.
59. Grisham MB., Mc Cord JM.: Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In: *Physiology of oxygen radicals*. Ed: Taylor AE, Malton S, Ward PA. American Physiology Society, Bethesda, Maryland, USA, pp: 1-18, 1986.
60. Mathers J., Fraser JA., McMahon M., Saunders RD., Hayes JD., McLellan LI.: Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. *Biochem Soc Symp.* (71):157-76, 2004.
61. Cochrane CG.: Cellular injury by oxidants. *Am J Med.* 30;91(3C):23-30, 1991.
62. Halliwell B., Gutteridge JMC.: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, 2001.
63. Scott Thomas, Brewer Marry. *Concise encyclopedia of biochemistry*. New York: de Gruyter, 1983: 505-6.
64. Levine Mark. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N Eng J Med* 1986; 3:892-902.
65. Horio F, Ozaki K, Kohmura M, Yoshida A, Makino S, Hayashi Y (1986). Ascorbic acid requirement for the induction of microsomal drug-metabolizing enzymes in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid, *J Nutr*, 116, 11, 2278-2289.
66. Moser UK (1990). Physiology and metabolism of ascorbic acid (review), Pages 3–16 in *Proc. 2nd Symp. Ascorbic Acid in Domes. Anim. C.* Wenk, R. Fenster, and L. Völker, ed. Kartause Ittingen, Switzerland.

67. Jacob RA (1999). Vitamin C In: Shils ME Olson JA, Shike M, Ross AC, Eds. Modern Nutrition in Health and Diseases, 9th ed. Baltimore, Williams and Wilkins.
68. Englard S, Seifter S (1986). The biochemical functions of ascorbic acid, Annu Rev Nutr, 6, 365-406
69. Seifter E, Crowley LV, Rettura G, Nakao K, Gruber C, Kan D, Levenson SM (1975). Influence of vitamin A on wound healing in rats with femoral fracture, Ann Surg, 181, 836-841.
70. Baspınar N ve Kurtoglu F (2003). Vitaminler, S.Ü. Veteriner Fak. Yayın Ünitesi, Konya.
71. Johnston CS, Corte C (1999). Tissue carnitine fluxes in vitamin C depleted-repleted guinea pigs, J Nutr Biochem, 10, 12, 696-699.
72. Haliloglu S, Baspınar N, Serpek B, Erdem H, Bulut Z (2002). Vitamin A And BCarotene Levels In Plasma, Corpus Luteum And Follicular Fluid Of Cyclic And Pregnant Cattle, Reprod. Dom. Anim., 37, 2, 96 – 99.
73. Serpek B, Baspınar N, Haliloglu S, Erdem H (2001). The Relationship Between Ascorbic Acid, Oestradiol 17b And Progesterone In Plasma And In Ovaries During The Sexual Cycle In Cattle, Revue Med Vet, 152, 3, 253 – 260.
74. Goetzl EJ, Wasserman SI, Gigli I, Austen KF. (1974). Enhancement of random migration and chemotactic response of human leukocytes by ascorbic acid, J Clin Invest, 53, 813-818.
75. Baspınar N, Bas AL, Haliloglu S, Elmas M, Yazar E (1998). The Effects Of Intracellular Vitamin C Concentrations On Bovine Neutrophils Functions In Vitro, Revue Med Vet, 149, 10, 931 – 938.
76. Orgill D, Demling RH (1988). Current concepts and approaches to wound healing, Crit Care Med, 16, 9, 899-908.
77. Scholl D, Langkamp-Henken B (2001). Nutrient recommendations for wound healing, J Intraven Nurs, 24, 124-132.

78. Nicosia RF, Belser P, Bonanno E, Diven J (1991). Regulation of angiogenesis in vitro by collagen metabolism, *In Vitro Cell Dev Biol*, 27A, 12, 961-966.
79. Waldorf H, Fewkes J (1995). Wound Healing, *Adv Dermatol*, 10, 77-96.
80. Mattsson C, Stierna P, Hellstrom S. Treatment with dexamethasone arrests the development of myringosclerosis after myringotomy. *Am J Otol* 2000;21:804-8.
81. Görür K. Timpanoskleroz ve miringosklerozun etiyopatogenezi. *Otoscope* 2004;4:125-9.
82. Selçuk A, Ensari S, Sargın AK, Can B, et al. Histopathological classification of tympanosclerotic plaques. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008;265:409-13.
83. Döner F, Yarıktas M, Dogru H, Uzun H, et al. The biochemical analysis of tympanosclerotic plaques. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;128:742-5.
84. Kilby D, Richard SH, Hart G. Grommet and glue-ears;a two-year result. *J Laryngol Otol* 1972;86:881-8.
85. Hussl B, Lim DJ. Fine morphology of tympanosclerosis. *Decker*,1984:348-53.
86. Chang IW.Tympanosclerosis.Electron microscopic study.*Acta Otolary* 1969;68:62-72.
87. Forseni Flodin M, Hultcrantz M. Possible inflammatory mediators in tympanosclerosis development. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002;63:149-54.
88. Asiri S, Hasham A, al Anazy F, Zakzouk S, et al. Tympanosclerosis: review of literature and incidence among patients with middle ear infection. *J Laryngol Otol* 1999;113:1076-80.

89. Karlidag T, Ilhan N, Kaygusuz, Keles E, et al. Comparison of free radicals and antioxidant enzymes in chronic otitis media with and without tympanosclerosis. *Laryngoscope* 2004;114:85-9.
90. Dawes PJD, Bingham BJ, Rhys R, Griffiths MV. Aspirating middle ear effusions when inserting ventilation tubes: does it influence post-operative otorrhoea, tube obstruction or the development of tympanosclerosis? *Clin Otolaryngol* 1991;16:457-61.
91. McRae D, Gatland DJ, Youngs R, Cook J. Aspiration of middle ear effusions prior to grommet insertion an etiological factor in tympanosclerosis. *J Otolaryngol* 1989 18(5):229-31.
92. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47:412-26.
93. Farber J, Kyle EM, Coleman JB. Biology of disease. Mechanism of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest* 1990; 62: 670-679.
94. Song JJ, Kwon SK, Cho CG, Park SW. The effect of caffeic acid phenethyl ester on the prevention of experimentally induced myringosclerosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007;71:1287-91.
95. Mattsson C, Marklund SL, Hellström S. Application of oxygen free radical scavengers to diminish the occurrence of myringosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:513-8.
96. Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg 2009;19(5):263-267
97. Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg 2010;20(6):299-304
98. Silverstein RJ, Landsman AS. The effects of a moderate and high dose of vitamin C on wound healing in a controlled guinea pig model. *J Foot Ankle Surg* 1999;38: 333-8.
99. Kayaalp SO. Suda çözünen vitaminler. In: Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 9. baskı, Ankara: Hacettepe-Tafl Kitapçılık; 2000. s. 1564-75.

100. Ackerman Z, Seidenbaum M, Loewenthal E, Rubinow A. Overload of iron in the skin of patients with varicose ulcers. Possible contributing role of iron accumulation in progression of the disease. *Arch Dermatol* 1988;124: 1376- 8.
101. Vaxman F, Olender S, Lambert A, Nisand G, Grenier JF. Can the wound healing process be improved by vitamin supplementation? Experimental study on humans. *Eur Surg Res* 1996;28:306-14.
102. Brown AA, Hu FB: Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 73:673– 686, 2001.
103. Kim DH, Park YS, Jeon EJ, Yeo SW, et al. Effects of tumor necrosis factor alpha antagonist, and nitric oxide synthase inhibitor on experimental otitis media with effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006;115:617-23.
104. Chao JC, Huang CH, Wu SJ, Yang SC, Chang NC, Shieh MJ, Lo PN: Effects of beta carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic smokers. *J Nutr Biochem.* 13:427-434, 2002.
105. Van Haaften RI, Evelo CT, Penders J, Eijnwachter MP, Haenen GR, Bast A: Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by tocopherols and alpha-tocopherol derivatives. *Biochim Biophys Acta.* 1548: 23-28, 2001.
106. Ryan AF, Bennett T. Nitric oxide contributes to control of effusion in experimental otitis media. *Laryngoscope* 2001;111:301-6.
107. Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg 2003;11(1):1-4)
108. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2005; 48: 65-68
109. Journal of the American College of Nutrition, Vol. 22, No. 1, 18–35 (2003)
110. GKD Cer. Derg. 1994;2:216-220
111. Van Tıp Dergisi: 11 (2):32-38, 2004

112. Jackson TS, Xu A, Vita JA, Keaney JF Jr. Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ Res* 1998;83:916-22.



9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Akif GÜNEŞ

Doğum Tarihi ve Yeri: 19.09.1983 Erzurum

Medeni Durumu: Evli

Adres: Basınevleri Mah. Selçuklu Cad. 24/B/33 Keçiören/ANKARA

Telefon: 05062534948

E-Posta: akif_gunes@hotmail.com

Mezun olduğu Tıp Fakültesi: Ondokuzmayıs Üniversitesi

Görev Yerleri:

Muş 112 Acil Sağlık Hizmetleri - Pratisyen Hekim (2007-2008)

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Anestezi ve

Reanimasyon ABD - Asistan Hekim - 2008

Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğt ve Arş hastanesi KBB Kliniği -

Asistan Hekim (2009-2013)

Yabancı Diller: İngilizce

10. ETİK KURUL ONAYI

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ :03/04/2013
TOPLANTI NO :2013-8
DOSYA NO :2013-54
KARAR NO :2013-8-61

Yürütücülüğünü Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kulak Burun Boğaz Kliniğinden Akif Güneş'in yaptığı ve araştırmacı olarak Murad Mutlu, Attila İşgören, Hasan Albasan, Halime Cengiz ve İstemihan Akın'ın katıldığı "Sistemik ve lokal askorbik asid kullanımının miringoskleroz ve travmatik zar perforasyonu iyileşmesi üzerine etkisi: Deneysel hayvan modeli" başlıklı araştırma projesinin içeriği kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 24
Geçerlilik Süresi : 15/04/2013 – 30/04/2013

ASLININ AYNIDIR
03/04/2013


Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU
A.Ü. HADYЕК Başkanı

