



SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
KAYSERİ EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KULAK BURUN BOĞAZ VE BAŞ BOYUN CERRAHİSİ KLİNİĞİ

**LEPTİNİN RAT TİMPANİK MEMBRAN KRONİK
PERFORASYONUNDAKİ ETKİSİ**

Dr. Mehmet TOFAR

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KAYSERİ-2018



SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
KAYSERİ EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KULAK BURUN BOĞAZ VE BAŞ BOYUN CERRAHİSİ KLİNİĞİ

**LEPTİNİN RAT TİMPANİK MEMBRAN KRONİK
PERFORASYONUNDAKİ ETKİSİ**

Dr. Mehmet TOFAR

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Mehmet YAŞAR

Bu uzmanlık tezi Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıpta Uzmanlık Eğitim Kurulu tarafından 16.11.2017 tarih ve 09 no'lu karar ile uygun görülmüş ve onaylanmıştır.

KAYSERİ-2018

TEŞEKKÜR

Bu tezin her aşamasında bilgi ve deneyimi ile yanımda olan, mesleki, akademik ve kiŐisel geliŐimimde katkıları bulunan ve asistanlık eğitimim boyunca gÖsterdiği değerli katkılardan dolayı tez danıŐmanım ve sayĐı değer hocam BaŐasistan DoÇ. Dr. Mehmet YAŞAR'a teşekkür ederim. Uzmanlık eğitimim boyunca bana bilgilerini, tecrübelerini, manevi yardım ve desteklerini esirgemeyen kıymetli hocalarım Prof. Dr. Cemil MUTLU'ya, DoÇ. Dr. İbrahim ÖZCAN'a, DoÇ. Dr. Murat DOĞAN'a teşekkür ederim. Cerrahi alanda farklı bilgi birikimleriyle her birinin bilgi birikiminden fazlasıyla yararlandığım, her zaman bana dostça yaklaşım göstermiş kıymetli abilerim Op. Dr. Ali BAYRAM, Op. Dr. Altan KAYA, Op. Dr. Mehmet KALKAN'a ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca tezin başından sonuna her aşamasında bana yol gösteren Op. Dr. İbrahim HIRA'ya, tezin deneysel aşamasında tecrübelerinden faydalandığım Op. Dr. Murat Salih GÜNEŞ'e ve istatistik değerlendirmesi için yardımını esirgemeyen Dr. Ruslan BAYRAMOV'a teşekkür ederim. Son olarak bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan sevgili anneme ve babama, destekleri ile her zaman yanımda olan kıymetli dostlarım Dt. İsmail DENİZ'e, Dt. Aslı ATASEVEN DENİZ'e, Dr. Fzt. Gökhan YAZICI'ya, Uzm. Fzt. Melek VOLKAN YAZICI'ya, Halil İbrahim EFKERE'ye teşekkür ederim.

Dr. Mehmet TOFAR

Ocak 2019, KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Timpanik Membranın Embriyolojisi.....	3
2.2. Timpanik Membranın Anatomisi	3
2.3. Timpanik Membranın Histolojisi	6
2.4. Rat Timpanik Membran Özellikleri	7
2.5. Timpanik Membran Perforasyonları	8
2.5.1. Timpanik Membran Perforasyon Nedenleri	8
2.5.1.1. Enfeksiyon	8
2.5.1.2. Travma	9
2.5.1.3. İyatrojenik	10
2.5.1.4. Kronik Süpüratif Otitis Media	10
2.5.2. Timpanik Membran Perforasyon Tedavisi	10
2.6. Timpanik Membran Yara İyileşmesi	12
2.7. Leptin	14
2.7.1. Leptinin Tarihçesi.....	14
2.7.2. Leptinin Özellikleri	14
2.7.3. Leptinin Fonksiyonları	15
2.7.4. Leptin ve Yara İyileşmesi.....	16
3. MATERYAL-METOD.....	17
3.1. Deney Hayvanları.....	17
3.2. Hayvanların Hazırlanması ve Deneysel İşlem	17
3.3. Histomorfolojik Değerlendirme	20
3.4. İstatistiksel Analiz.....	22

4. BULGULAR	23
4.1. Subepitelyal Kalınlık.....	26
4.2. Fibroblast Proliferasyonu	28
4.3. Lökosit İnfiltrasyonu	31
4.4. Neovaskülarizasyon	34
4.5. Timpanik Membran Kalınlıkları	36
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇLAR	47
KAYNAKÇA	50



KISALTMALAR

ANT	: Anterior
bFGF	: Basic Fibroblast Growth Faktör
DKY	: Dış Kulak Yolu
DNA	: Deoksiribo-nükleik asit
EGF	: Epidermal Growth Faktör
EGFR	: Epidermal Growth Faktör Reseptörü
FGF	: Fibroblast Growth Faktör
İT	: İntratimpanik
İP	: İntraperitoneal
JAK-STAT	: Janus kinaz-sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörleri
kDa	: Kilodalton
KGf	: Keratinosit Growth Faktör
LP	: Lamina Propria
PDGF	: Platelet Derived Growth Faktör
PF	: Pars Flaksida
POST	: Posterior
PT	: Pars Tensa
TGF	: Transforming Growth Faktör
TM	: Timpanik Membran
VT	: Ventilasyon Tüpü

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Kulak yapıları koronal kesit.	4
Şekil 2.	Timpanik membranın önemli anatomik noktaları ve topografik kadranları (14).....	5
Şekil 3.	Timpanik membran epitel tabakalarının şematik görünümü.	7
Şekil 4.	Rat ve insan timpanik membranının karşılaştırmalı şekli (PF: Pars flaksida, PT: Pars tensa, ANT: Anterior, POST: Posterior)	8
Şekil 5.	Leptinin Yapısı.....	14
Şekil 6.	Leptinin proanjiogenik aktivitesi.	16
Şekil 7.	Topikal uygulamada kullanılan mikropipet.....	19
Şekil 8.	Çalışmanın deneysel aşamasının yapılışı.....	19
Şekil 9.	Hematoksilen ve eozin ile boyalı topikal leptin verilen gruptan bir ratın TM histopatolojik görüntüsü.	21
Şekil 10.	Hematoksilen ve eozin ile boyalı İP leptin verilen gruptan bir ratın TM histopatolojik görüntüsü.....	21
Şekil 11.	Normal rat TM otoendoskopik görüntüsü.....	23
Şekil 12.	PT bölümüne perforasyon yapılan rat TM otoendoskopik görüntüsü	23
Şekil 13.	Topikal leptin verilen gruptan bir ratın çalışma bitimindeki TM otoendoskopik görüntüsü	24
Şekil 14.	Topikal olarak fosfat tampon çözeltisi verilen gruptan bir ratın çalışma bitiminde perfore kalan TM otoendoskopik görüntüsü	24
Şekil 15.	İP leptin verilen gruptan bir ratın çalışma bitimindeki TM otoendoskopik görüntüsü	25
Şekil 16.	Topikal salin verilen gruptan bir ratın çalışma bitimindeki TM otoendoskopik görüntüsü	25
Şekil 17.	Sham grubundan bir ratın çalışma bitiminde perfore kalan TM otoendoskopik görüntüsü	26
Şekil 18.	Subepitelyal kalınlık derecelerinin oranlarını gösteren grafik.....	27
Şekil 19.	Subepitelyal kalınlık derecelerinin ortalama değerlerini gösteren grafik	27
Şekil 20.	Fibroblast proliferasyon derecelerinin oranlarını gösteren grafik	29

Şekil 21. Fibroblast proliferasyon derecelerinin ortalama değerlerini gösteren grafik.....	30
Şekil 22. Lökosit infiltrasyon derecelerinin oranlarını gösteren grafik	32
Şekil 23. Lökosit infiltrasyon derecelerinin ortalama değerlerini gösteren grafik.....	33
Şekil 24. Neovaskularizasyon derecelerinin oranlarını gösteren grafik.....	35
Şekil 25. Neovaskularizasyon derecelerinin ortalama değerlerini gösteren grafik.....	36



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1.	Çalışma grupları	18
Tablo 2.	Subepitelyal kalınlık derecelerinin ortalama değerleri	28
Tablo 3.	Çalışma gruplarının fibroblast proliferasyonu açısından istatistiksel olarak birbirleri ile karşılaştırılması	30
Tablo 4.	Fibroblast proliferasyon derecelerinin ortalama değerleri.....	31
Tablo 5.	Çalışma gruplarının lökosit infiltrasyonu açısından istatistiksel olarak birbirleri ile karşılaştırılması	33
Tablo 6.	Lökosit infiltrasyon derecelerinin ortalama değerleri	34
Tablo 7.	Çalışma gruplarının neovaskülarizasyon açısından istatistiksel olarak birbirleri ile karşılaştırılması	36
Tablo 8.	Neovaskülarizasyon derecelerinin ortalama değerleri.....	37
Tablo 9.	Timpanik membran kalınlıklarının ortalama değerleri.....	37

LEPTİNİN RAT TİMPANİK MEMBRAN KRONİK PERFORASYONUNDAKİ ETKİSİ

ÖZET

Amaç: Leptinin topikal uygulamadaki yara iyileşmesine olumlu etkisinin, rat timpanik membran kronik perforasyon modelinde etkili olup olmadığının histolojik ve klinik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde üretilen, ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen, 6 aylık, 42 adet sprague dawley cinsi erişkin dişi rat kullanıldı. Rat timpanik membranlarında termal hasar ile kronik perforasyon modeli oluşturuldu. 42 rat (84 kulak) daha sonra randomize olarak beş gruba ayrıldı. A grubuna (10 rat) topikal saline (Serum fizyolojik % 0.9, Eczacıbaşı, Türkiye), B grubuna (10 rat) topikal leptin (Leptin human 1 mg flakon, SİGMA-Life Science, Almanya), C grubuna (10 rat) topikal fosfat tampon çözeltisi (Phosphate Buffered Saline tablet-PBS tablet, SİGMA-Life Science, Almanya), D grubuna (10 rat) intraperitoneal leptin (Leptin human 1 mg flakon, SİGMA-Life Science, Almanya) verilmesi planlandı. E grubunda (2 rat) sham grubu olarak belirlendi ve perforasyon sonrası madde tatbik edilmedi. Çalışmanın anestezisi aşamasında A ve B grubundan birer adet ratta kayıp yaşandı ve çalışma toplam 40 rat (80 kulak) ile tamamlandı. Sonrasında çalışma bitiminde rat timpanik membranları klinik olarak muayene edildi. Muayene sonrası ratlar sakrifiye edilerek timpanik membranları, subepitelyal kalınlık, fibroblast proliferasyonu, lökosit infiltrasyonu, neovaskülarizasyon gibi parametreler yönünden histopatolojik olarak değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmamızda topikal fosfat tampon çözeltisi verilen gruptan bir timpanik membran ve sham grubundan bir timpanik membran haricindeki tüm timpanik membran perforasyonlarının klinik olarak kapandığı görüldü.

Çalışma grupları subepitelyal kalınlık derecelerinin oranları açısından karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$).

Gruplar fibroblast proliferasyon derecelerinin oranları açısından karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). Sham grubunun fibroblast proliferasyon derecelerinin oranı, topikal leptin grubuna göre anlamlı oranda artmış olarak izlendi

($p=0.0186$). Topikal fosfat tampon çözeltisi verilen grup ve intraperitoneal leptin grubu fibroblast proliferasyonu derecelerinin oranları açısından kıyaslandığında C grubunun ortalama değerleri, D grubuna göre anlamlı oranda artmış olarak izlendi ($p=0.0024$). Gruplar arasında en anlamlı ilişki intraperitoneal leptin ve sham grubu arasında saptandı. Sham grubunun fibroblast proliferasyon derecelerinin oranları intraperitoneal leptin grubuna göre anlamlı oranda artmış olarak izlendi ($p=0.0004$).

Gruplar lökosit infiltrasyon oranı açısından kıyaslandığında; gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). Topikal fosfat tampon çözeltisi verilen grubun lökosit infiltrasyon oranı, topikal leptin grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p=0.0002$). Sham grubunun lökosit infiltrasyon oranı, topikal leptin grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p=0.0009$). Sham grubunun lökosit infiltrasyon oranı, intraperitoneal leptin grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p=0.0001$). Topikal fosfat tampon çözeltisi verilen grubunun lökosit infiltrasyon oranı, intraperitoneal leptin grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p<0.0001$).

Gruplar neovaskülarizasyon oranları açısından karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). Topikal fosfat tampon çözeltisi verilen grubun neovaskülarizasyon derecelerinin oranı, topikal leptin grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p=0.0069$). Sham grubunun neovaskülarizasyon derecelerinin oranı, topikal leptin grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p=0.0050$). Sham grubunun neovaskülarizasyon derecelerinin oranı, intraperitoneal leptin grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p=0.0005$). Topikal fosfat tampon çözeltisi verilen grubun neovaskülarizasyon derecelerinin oranı, intraperitoneal leptin grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p<0.0001$).

Çalışma grupları timpanik membran kalınlıkları açısından karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$).

Sonuç: Leptinin sistemik ve/veya topikal kullanımı rat timpanik membran kronik perforasyon iyileşmesini olumsuz etkilemektedir.

Anahtar Kelimeler: Hayvan deneyi, Leptin, Rat, Timpanik membran perforasyonu, Yara iyileşmesi

THE EFFECT OF LEPTIN ON CHRONIC PERFORATION OF RAT TYMPANIC MEMBRANE

ABSTRACT

Objective: The aim of present study was the clinical and histological investigation of the positive effect of topical leptin application on wound healing of rat tympanic membrane chronic perforation model.

Materials and Methods: In our study, 42 adult female sprague dawley rats aged 6 months, produced at Erciyes University Experimental Research Center, weighing between 250-300 g were used. A chronic perforation model was established with thermal damage in rat tympanic membrane. Forty-two rats (84 ears) were then randomized into five groups. In group A (10 rats) topical saline (physiological saline solution 0.9% Eczacibasi, Turkey), in group B (10 rats) topical leptin (Leptin human 1 mg vial of Sigma-Life Science, Germany), in group C (10 rats) topical phosphate buffer solution (Phosphate Buffered Saline tablet, Sigma-Life Science, Germany), in group D (10 rats) intraperitoneal leptin (Leptin human 1 mg vial, Sigma-Life Science, Germany) were planned to be applied. Group E (2 rats) was designated as the Sham group and no substance was applied after perforation. During the anesthetic phase of the study, one rat from group A and one rat from group B were lost, and the study was completed with a total of 40 rats (80 ears). At the end of the study, rat tympanic membranes were clinically examined. After the examination, the rats were sacrificed and the tympanic membranes were histopathologically evaluated according to parameters such as subepithelial thickness, fibroblast proliferation, leukocyte infiltration and neovascularization.

Results: In our study, it could be seen that all tympanic membranes except one tympanic membrane perforation in the group which topical phosphate buffer solution was given, and one tympanic membrane perforation from the Sham group were clinically closed.

When the study groups were compared in terms of the proportion of subepithelial thickness grades; no significant difference was found between the groups ($p > 0.05$).

When the groups were compared in terms of the proportion of fibroblast proliferation grades; significant difference was found between the groups ($p < 0.05$). The degree of fibroblast proliferation in the sham group was significantly increased compared to the

topical leptin group ($p = 0.0186$). When the ratios of fibroblast proliferation rates of the topical phosphate buffer solution administered group and the intraperitoneal leptin group were compared, the mean values of group C were found to be significantly higher than group D ($p = 0.0024$). The most significant relationship between the groups was found between the intraperitoneal leptin and sham group. The proportion of fibroblast proliferation grades in the sham group was significantly increased compared to the intraperitoneal leptin group ($p = 0.0004$).

When the groups were compared in terms of leukocyte infiltration rates; significant difference was found between the groups ($p < 0.05$). The leukocyte infiltration rate of the group administered topical phosphate buffer solution was significantly higher than that of the topical leptin group ($p = 0.0002$). The leukocyte infiltration rate of the sham group was significantly higher than that of the topical leptin group ($p = 0.0009$). The leukocyte infiltration rate of the sham group was found to be significantly increased compared to the intraperitoneal leptin group ($p = 0.0001$). The leukocyte infiltration rate of the group administered topical phosphate buffer solution was significantly increased compared to the intraperitoneal leptin group ($p < 0.0001$).

When the groups were compared in terms of neovascularization rates; significant difference was found between the groups ($p < 0.05$). The neovascularization ratios of the group administered topical phosphate buffer solution was significantly higher than that of the topical leptin group ($p = 0.0069$). The neovascularization ratios of the sham group were significantly higher than that of the topical leptin group ($p = 0.0050$). The neovascularization ratios of the sham group were significantly increased compared to the intraperitoneal leptin group ($p = 0.0005$). The neovascularization ratios in the topical phosphate buffer solution group was significantly increased compared to the intraperitoneal leptin group ($p < 0.0001$).

When the study groups were compared in terms of tympanic membrane thickness; no significant difference was found between the groups ($p > 0.05$).

Conclusion: Systemic and / or topical administration of leptin adversely affects the recovery of chronic tympanic membrane perforation in rats.

Key words: Animal experimentation, Leptin, Rat, Tympanic membrane perforation, Wound healing

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Timpanik membran (TM), titreşim özelliği bulunan ses iletiminin önemli bir komponentidir. Çeşitli nedenlerle TM'da delik ve yırtılmalar oluşmasına TM perforasyonu denir (1). Timpanik membran perforasyonu insanlarda klinik olarak sık görülen bir sağlık problemidir. İnsidansı tüm dünyada % 1 olarak verilmesine rağmen bu oran tahminlerin altında kalmaktadır (2).

TM perforasyon nedenleri olarak künt travmalar, delici travmalar, barotravmalar (hiperbarik oksijen tedavisi), akustik travmalar, iyatrojenik travmalar (miringotomi ve ventilasyon tüpü takılması, kulak kanalından serumenin temizlenmesi, kulak lavajı) ve enfeksiyon gösterilebilir (2). Travmatik perforasyonların % 80'i kendiliğinden iyileşir ve normal fonksiyonlarına geri döner. Doku kaybı, enfeksiyon gibi faktörler ise bu perforasyonun açık kalmasına neden olarak kalıcı perforasyon oluştururlar (3).

TM perforasyonlarında yapılabilecek tedavi yöntemleri hakkında çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Çalışmalarda perforasyon kenarlarındaki kapanmaya engel olan epitelin ortadan kaldırılarak fibröz tabakadaki fibroblastik aktiviteyi tetiklemek için perforasyon kenarlarının % 10'luk triklor asetik asit ile koterizasyonu sonucunda, pars tensanın % 65'inden daha az yer kaplayan perforasyonların % 80'lere varan oranlarda kapandığı bildirilmiştir (4).

Kronik perforasyonlarda skuamöz epitel, perforasyonun kenarından zarın mukozal tabakasına ilerler ve onunla birleşir. Yara kenarının epitelizasyonu spontan iyileşmeyi engeller. TM'nın rejenerasyonunu hızlandırmak için hyaluronan, heparin, epidermal growth faktör (EGF), basic fibroblast growth faktör (bFGF) gibi değişik moleküller kullanılmıştır (5, 6).

Leptin 145-146 aminoasit içeren protein yapısında bir hormondur, molekül ağırlığı 16 kilodalton (kDa)'dur. Yapısı IL-6 ve IL-11 ile benzerlik gösterir. Biyolojik aktiviteden N terminal bölgesi sorumludur (7). Leptinin reseptörüne bağlanması, Janus kinaz-sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörleri (JAK-STAT) kaskadının başlamasına neden olur. Leptinin etkilerinin çoğu hipotalamustaki reseptörlerine bağlanma sonucu

ortaya çıkar, bununla birlikte periferik etkileri de vardır. Anjiogenez, yara iyileşmesi, kan basıncının düzenlenmesi üzerine leptinin periferik etkileri olduğunu destekleyen bilimsel kanıtlar ileri sürülmüştür. Leptin çeşitli hücre tiplerinde proliferatif ve anti-apoptotik etkiler gösterir. Hem in vitro hem in vivo çalışmalar, leptinin anjiogenezi ilerletici aktivitesi olduğunu göstermiştir. Bununla beraber ob/ob farelere sistemik veya topikal olarak leptin verilmesi anjiogenezi etkilemeden yara iyileşmesini hızlandırmaktadır (8, 9).

Çalışmada leptinin topikal uygulamadaki yara iyileşmesine olumlu etkisinin, rat TM kronik perforasyon modelinde etkili olup olmadığının histolojik ve klinik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Timpanik Membranın Embriyolojisi

Dış, orta ve iç kulak üç ayrı germ yaprağından gelişir. Dış kulak ve orta kulak, üst solunum ve sindirim sisteminin geliştiği brankial, faringeal yarık ve ceplerden gelişirken; iç kulak, beyinde rhombencephalonun karşılığına denk gelen dış ektodermden gelişir.

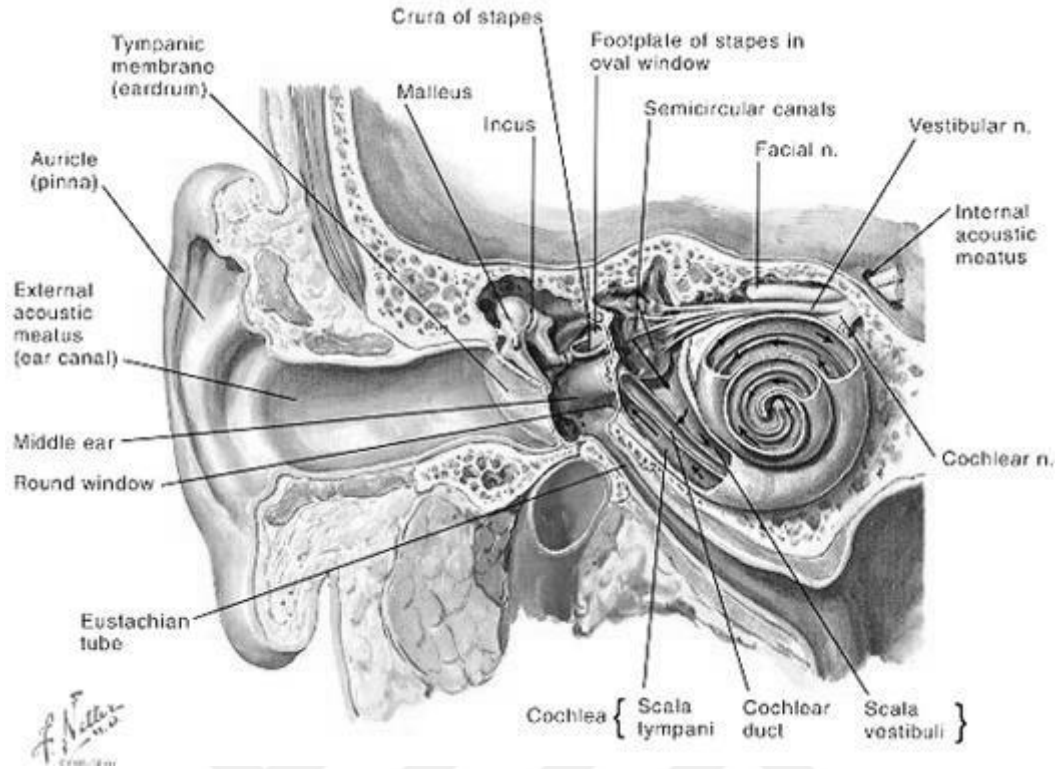
TM'nin lateral yüzü birinci ektodermal yarığın ektodermi ile medial yüzü ise birinci endodermal cebin endoderminden gelişirken, bu iki tabakanın arasına fibröz tabakayı oluşturacak olan mezoderm girmiştir.

İntramembranöz yolla kemikleşen timpanik ringi oluşturan merkezler dokuzuncu hafta içerisinde ortaya çıkarlar. Kısa sürede birbirleri ile birleşip dış kulak yolunun (DKY) tam olarak şekillenmesini sağlarlar. Dördüncü aydan sonra sulkus oluşmaya başlar. Beşinci ayda ise değişik noktalardan kemikleşme başlar. Timpanik ring hiçbir zaman tam olarak çember halini almaz ve kraniyal kısmı açık alır. Burası timpanik incisura veya Rivinus çentiği olarak isimlendirilen bölgedir. Timpanik ring arka kadranda temporal kemiğin geri kalan kısmıyla birleşir. Bu birleşme hızla ilerler ve doğumda timpanik ring tamamen timpanik kemiğin geri kalan kısımlarına yapışmıştır. Bu sırada timpano-skumöz ve timpano-petroz sütür hatları ortaya çıkar.

Timpanik ringin oluşması birinci ektodermal yarığı üstte DKY'nu yapacak kısım ve altta daha sonra oblitere olacak olan açıklık olmak üzere iki kısma ayrılır. Alttaki kısım timpanik kavitenin lateral duvarının alt kısmını yapar. Burası çocuklarda açıktır ve Huschke forameni olarak adlandırılır. Bu foramen timpanik kemiğin büyümesi ile adolesana kadar kaybolur (10).

2.2. Timpanik Membranın Anatomisi

İşitme ve denge fonksiyonlarının periferik organı olan kulak; dış, orta ve iç kulak gibi farklı yapısal ve işlevsel görevleri olan kısımlardan oluşmuştur. Kulak temporal kemik içinde konumlanmıştır (10). Şekil 1 'de kulak yapılarını gösteren bir kesit verilmiştir.

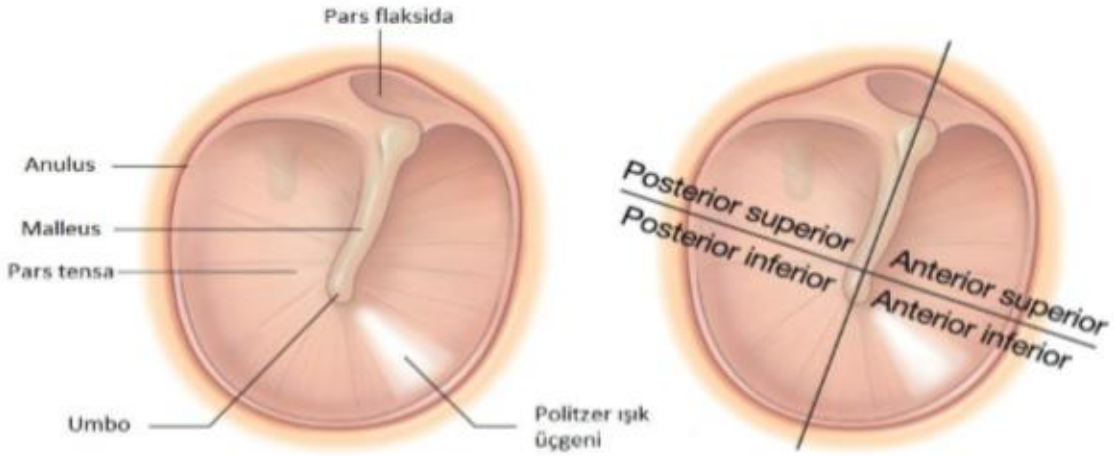


Şekil 1. Kulak yapıları koronal kesit (11).

TM orta kulak boşluğunun lateralinde yer alır. Dış kulak ve orta kulağı birbirinden ayıran şeffaf bir perde biçimindedir. Horizontal çapı 8-9 mm, vertikal çapı 9-10 mm'dir (12). Elektron mikroskopik ölçümlerde TM kalınlığı PT için 30-90 µm ölçülürken, PF için ise 30-230 µm olarak ölçülmüştür (13). Timpanik bölüm sulkus timpanikus içine fibrokartilajinöz bir yapı olan anulus fibrosus ile tespit edilmiştir. Buna timpanomeatal halka denir. Skuamöz kemiğin aşağı doğru giden uzantısı skutum adını alır. Bu skutumun doldurduğu timpanomeatal halkanın açıkta kalan üst ucuna ise Rivinus Çentiği denir (12).

Timpanik kemiğin her iki uzantısının bitim noktalarından malleus başına doğru, plika malleolaris anterior ve posterior denen iki adet plika uzanır. Bunlar kulak zarını malleusa bağlar. Kulak zarının bu ligamanların altında kalan, timpanik kemik içerisindeki gergin ve esas titreşen kısmına pars tensa (PT) adı verilir. Rivinus çentiğini dolduran geri kalan kısmı ise daha gevşek bir yapıda olan pars flaksida (PF) adını alır (12). PF'nin diğer adı Sharapnell membrandır (Şekil 2).

Malleusun TM'a tutunduğu, TM'ın orta kulağa doğru çöken en derin bölgesine umbo adı verilir. Umbodan başlayıp manibrium eksenine dik çizilen çizgi; PT'yı, antero-süperior, antero-inferior, postero-süperior ve postero-inferior olmak üzere dört hayali parçaya ayırır (Şekil 2). Kulak zarı eğimli bir biçimde konumlanmış olup posterior kenarı anteriora göre daha lateral yerleşimlidir (10).



Şekil 2. Timpanik membranın önemli anatomik noktaları ve topografik kadrantları (14).

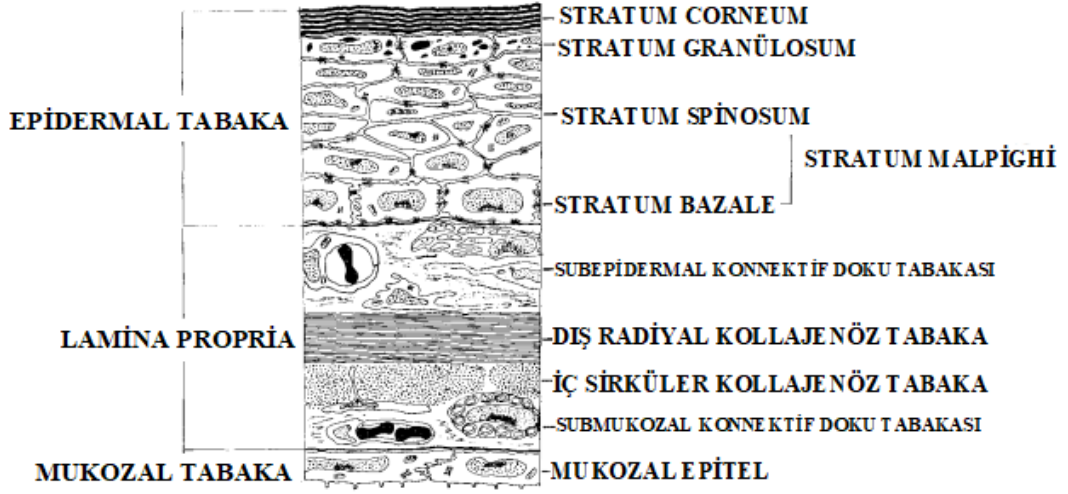
TM internal ve eksternal pleksuslarla beslenir. Eksternal pleksusu, maksiller arterin dalı olan derin aurikuler arterin timpan dalı oluşturur (15). İnternal pleksusu ise, internal maksiller arterden, posterior aurikuler ve stilomastoid arterden gelen dallar oluşturur (10). Zarın arka yarısı, ön yarısına göre daha iyi kanlanır. Zarın ön yarısı anulus çevresinden gelen küçük dallarla kanlanırken, arka yarısının kanlanması malleoler arterle olur (16). Venöz drenaj; arterlere paralel seyrederek, orta kulak ve DKY venlerine doğru olur. Timpan membran tragus önü ve mastoid apekte yerleşmiş servikal lenf nodlarına ya da östaki tüpünün lenfatiklerine drene olur (10). Timpan membranın DKY'na bakan lateral yüzünün ön kısmını; trigeminal sinirin aurikulotemporal dalı, arka kısmını; vagusun Arnold siniri adı verilen dalı inerve eder. Orta kulağa bakan medial yüzü ise glossofarengeal sinirin dalı olan Jacobson siniri tarafından inerve edilir (15).

2.3. Timpanik Membranın Histolojisi

TM histolojik olarak üç tabakadan oluşur. Bunlar lateralde DKY epitel, medialde orta kulak mukozası ve bu iki tabaka arasındaki fibröz tabaka, lamina propria (LP)'dır. Ortalama 130 µm kalınlığında olan zarın içteki mukozal tabakası 1 µm'den daha ince, dıştaki epitel tabakası 30 µm, ortadaki lamina propria ise 100 µm kalınlıktadır (15). PT ve PF arasındaki temel histolojik fark; PF'da fibröz tabaka bulunmamasıdır. PT'nın uç kısımlarında fibröz tabaka kalınlaşarak anulus fibrocartilagineus adı verilen halkayı oluşturur (10).

Dıştaki epitel tabaka; sırayla stratum korneum, stratum granulosum, stratum spinosum ve stratum bazaleden oluşur. Bazal tabakadaki hücreler bölünerek üstteki hücrelerin yerini alır (15). Epitel tabaka umbodan periferde doğru epitel migrasyonu ile klirensi sağlar (17). TM derisi ile DKY kemik komponentinin derisi, TM merkez olmak üzere dışa doğru bir hareket özelliği olduğunu ilk defa Burnett tanımlamıştır. Bu deri tabakasının zar merkez olmak üzere dışa doğru hareketine sentrifugal migrasyon denir. Migrasyon hızı merkezden periferde doğru giderek artmakla beraber bir elin baş parmağı tırnağının büyüme hızına eşittir. En hızlı migrasyon ise DKY kemik bölümünün anterior duvarında saptanmıştır. Işınsal hareket zarda oluşan perforasyon durumlarında yön değiştirebilir. Sentrifugal migrasyon travmatik zar perforasyonlarının onarımında önemli bir role sahiptir (10).

Ortakdaki fibröz tabakada; vasküler yapılar, endotel hücreleri, fibroblastlar, sinirler ve gevşek bağ dokusu yer alır. Fibröz tabaka; dışta radyal, içte sirküler kollajen liflerden oluşmakla beraber ince retiküler liflerde içerir (17). Bu lifler LP'yı subepitelyal ve submukozal olmak üzere iki kata ayırır. Fibröz tabaka kapillerden fakir olduğu için negatif basınca duyarlıdır ve dış etmenlerden kolayca etkilenir. Sirküler tabakadaki parabolik, semisirküler ve transvers lifler sayesinde kulak zarında gerginlik sağlanır ve zar kolay titreşir. PT'nın LP'sı esas olarak tip II kollajenden oluşurken, PF'da tip I kollajen bulunur (10, 18). Zarın PT ve PF bölümlerinde mukozal yüzeyler aynıdır. Her iki bölümde de mukozal yüzeyde belirgin mikrovilli kısa kübik hücreler ve aralarında stratifiye kolumnar epitel bulunur. TM'nın orta kulak mukozası yapışma yerine yakın mukozal yüzeyinde yer yer goblet hücreleri bulunmaktadır (19).

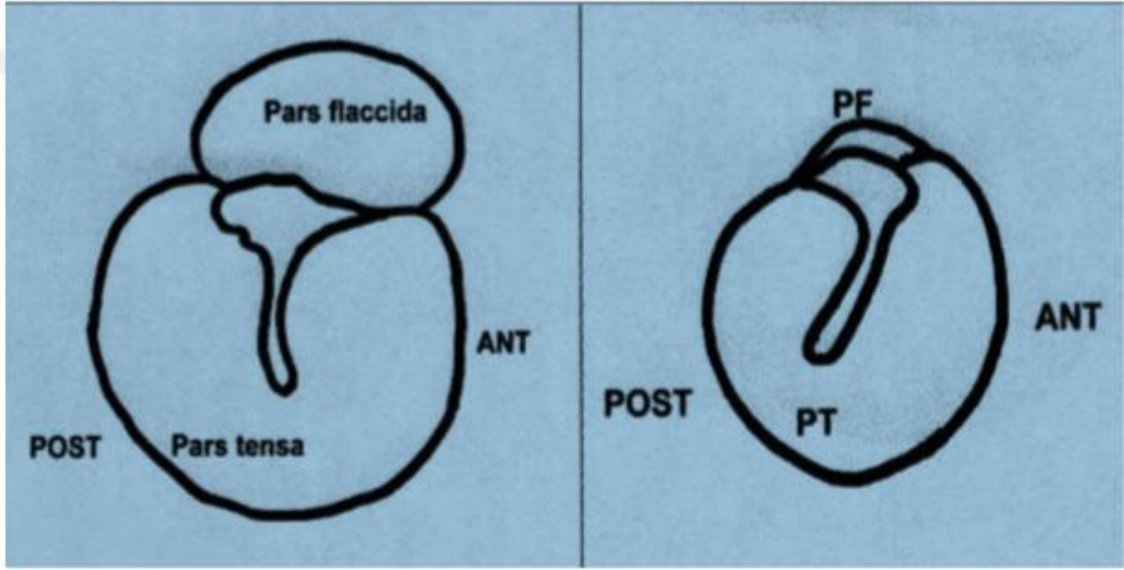


Şekil 3. Timpanik membran epitel tabakalarının şematik görünümü (20).

2.4. Rat Timpanik Membran Özellikleri

Rat ve insan TM'ı birbirine benzesede anatomik olarak bazı farklılıkları vardır. Renk ve şekil olarak insan TM'ına benzer ancak daha ince ve şeffaf yapıdadır. Bu nedenle diseksiyonda kolayca yırtılabilir (21). İnsan TM kalınlığı ortalama 130 μm iken, rat TM elips şeklindedir ve kalınlığı ortalama 5 μm 'dir. Horizontal düzlemle 20 derecelik açı yapar. İnsan TM'ı lateralde DKY epiteli, medialde orta kulak mukozası ve bu iki tabaka arasındaki fibröz tabakadan oluşurken; ratlarda zarın iç yüzünü de dış yüzü gibi yassı epitel oluşturmaktadır. Orta tabakayı fibröz LP oluşturur. Fibröz tabaka anulus fibrosusa uzanıp timpanik olukta periosta yapışır (15, 22).

İnsan TM alanı ortalama 66 mm^2 olmakla beraber PF, TM'ın % 3-6'lık kısmını oluşturur. Rat TM alanı ise ortalama 11 mm^2 'dir ve PF, TM'ın % 25-29'luk kısmını oluşturur. TM anterior-posterior çapı insanda ortalama 9-10.2 mm iken; ratta ortalama 2.2-2.4 mm'dir. İnsanda malleusun kısa kolu posterioru gösterir ve malleus posterior duvara yönelim gösterir. Ratta malleusun kısa kolu anterioru gösterir ve malleus inferiora doğru eğilim gösterir (23).



Rat TM Görünümü

İnsan TM Görünümü

Şekil 4. Rat ve insan timpanik membranının karşılaştırmalı şekli (PF: Pars flaksida, PT: Pars tensa, ANT: Anterior, POST: Posterior) (23).

2.5. Timpanik Membran Perforasyonları

Çeşitli sebeplerle TM'da delik ve yırtık oluşmasına TM perforasyonu denir. TM perforasyonları, yerleşim yerine göre santral veya marjinal olarak adlandırılırlar. Santral perforasyonlar anulusa temas etmeyen tüm kadrantlarda bakiye zarın bulunduğu, zarın PT kısmında bulunan perforasyonlardır. Santral perforasyonlar, kolesteatom birlikteliği daha az olduğu için güvenli perforasyonlardır. Kronik otitis mediada santral perforasyon varlığı akla tubotimpanik bir patolojinin varlığını getirmelidir (10). Marjinal perforasyonlar ise; anulusa temas eden, perforasyonla DKY arasında zar kalıntısının bulunmadığı perforasyonlardır. Bu nedenle de kolesteatom marjinal perforasyonlarda daha sık görülür (24).

2.5.1. Timpanik Membran Perforasyon Nedenleri

2.5.1.1. Enfeksiyon

TM dış ortam ile vücut kavitesini birbirinden ayıran ince bir zar olduğu için süpüratif enfeksiyonlarda delinmesi beklenen bir durumdur. Zar perforasyonunun en sık nedeni

enfeksiyonlardır (25). Oluşan perforasyonun lokalizasyonu ve büyüklüğü enfeksiyon ajanının türüne, enfeksiyonun şiddetine ve kronik olma durumuna göre değişir. Ancak rekürren orta kulak enfeksiyonlarında, zar rejenerasyon sürecini tamamlayamaz ve kalıcı perforasyon görülebilir. Komplikasyonsuz akut otitis mediada perforasyonlar küçüktür ve çoğunlukla spontan kapanır (4). Santral büyük böbrek şeklinde perforasyonlar ise genellikle beta hemolitik streptokok gibi nekrotizan organizmaların enfeksiyonundan kaynaklanır. Enfeksiyon nedenli perforasyonlar gelişmiş ülkelerin düşük sosyoekonomik düzeyli bireylerinde veya gelişmekte olan ülkelerin bireylerinde sık görülür. Daha nadir görülen diğer enfeksiyon nedenleri ise viral otitler (herpes zoster otikus), tüberküloz ve mediale doğru ilerleyen eksternal otitlerdir (25).

Akut enfeksiyon durumunda orta kulakta biriken sıvı zarın dışarı doğru bombeleşmesine ve kızarılaşmasına neden olur. Zarın merkezinde damarlanma daha fazladır ve iskemi sonucunda püy buradan eksude olur. Beta hemolitik streptokok enfeksiyonlarında ise zarda fulminan nekroz vardır. Yıkım orta kulaktaki püyden çok bakteriyel toksin kaynaklıdır (26).

2.5.1.2. Travma

Travma, TM perforasyonlarının temel nedenlerinden biridir. Bunlar barotravma (hiperbarik oksijen tedavisi), çarpmalar, akustik travma, delici travmalardır. Özellikle künt travmalarda TM perforasyonları görülürken; bunlar longitudinal temporal kemik kırıklarıyla birliktelik gösterir. Askeri travmalarda zar orta kulağa doğru yer değiştirerek kolesteatoma zemin hazırlar. Penetran travmalar ise daha çok pamuklu çubuklarla buşon temizliği sonrası görülür (26). Barotravma da künt travma çeşidi olmakla beraber; çalışmalar yarım atmosfer basıncın kulak zarında çökme, 2 atmosfer basıncın ise zarda malleolar pleksusta konjesyonla zarda büyük değişiklikler oluşturabileceğini göstermiştir (25).

Travmatik perforasyonlar, 26-35 dB'lik iletim tipi işitme kaybına neden olurlar. Genellikle posteroinferior kadranda görülürler ve spontan iyileşme eğilimindedirler (27). Perforasyonun büyüklüğü arttıkça ve hasta yaşı arttıkça spontan iyileşme oranı azalır (28).

2.5.1.3. İyatrojenik

Buşon temizliği, miringotomi, ventilasyon tüpü (VT) takılması gibi nedenler iyatrojenik grubu oluşturur (29).

En sık cerrahi kapama gerektiren TM perforasyonları ventilasyon tüpüne bağlı oluşan perforasyonlardır. VT uygulamasına bağlı kalıcı perforasyon oranı kısa süreli tüpler için % 1-4, uzun süreli tüpler için ise % 12-25 arasında bildirilmektedir (30). Perforasyona kalıcı denmesi için tüpün atıldıktan sonra 6 ay- 1 yıl geçmesi gerekir (31). 36 ay geçmesine rağmen hala atılmayan tüplerde, cerrahi olarak çıkarılsalarda kalıcı perforasyon riski artar (32). Tüpün kalış süresi, zarın atrofik olması, tekrarlayan VT tatbiki, otere oluşması, tüpün çeşidi perforasyon üzerinde etkilidir (33). VT kendiliğinden düşebilir veya cerrahi olarak çıkarılabilir. Kalıcı perforasyon riski cerrahi olarak çıkarılanlarda daha fazladır. Nichols ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (32), üç ve üzerinde VT tatbiki uygulanan çocukların % 42'sinde kalıcı perforasyon görülürken, iki ve daha az VT tatbiki yapılan çocukların % 24'ünde kalıcı perforasyon görüldüğü bildirilmiştir.

2.5.1.4. Kronik Süpüratif Otitis Media

Kronik süpüratif otitis media, perforasyon veya VT tatbiki sonrası bütünlüğü bozulan zardan uzun süreli akıntı ile seyreden bir hastalıktır (26). Sıklıkla kronik süpüratif otitis media ile kolesteatom birliktelik gösterir. Ancak tüm kolesteatom olguları kronik süpüratif otitis media ile ilişkili olmadığı gibi tüm kronik süpüratif otitis medialı hastalarda da kolesteatom görülmez. VT olan çocuklarda kronik süpüratif otitis media insidansı % 1-3'ten düşüktür. Kronik süpüratif otitis media olgularında en sık pseudomonas aeruginosa ve staphylococcus aerus izole edilir. Bazı çalışmalarda anaerob bakterilere de rastlanmıştır (25).

2.5.2. Timpanik Membran Perforasyon Tedavisi

Kulak zarı cerrahisinin temelleri antik Mısır ve Hipokrat dönemine kadar uzanmaktadır. İlk TM perforasyon onarımı Marcus Banzer tarafından 1640 yılında domuz mesanesi

kullanılarak yapılmıştır. 1841 yılında Yearsley TM perforasyon onarımında gliserin emdirilmiş yünü kullanırken, Toynbee ise 1853 yılında kauçuk benzeri bir maddeyi perforasyon onarımında kullanmıştır (4). Bilinen ilk gerçek anlamda miringoplastiyi ise 1878 yılında Berthold otogreft kullanarak gerçekleştirmiştir. Berthold dezepitelize zar perforasyonunu, ön koldan aldığı full-thickness deri grefti ile kapatmış ancak geç dönem sonuçları tahminleri yerine getiremediğinden otogreft kullanımını çağdaşlarına kabul ettirememiştir. Bu ameliyatlara antibiyotik ve steril teknikteki yetersizliklere bağlı olarak terkedilmiştir (34).

Kulak cerrahisindeki ilerlemeler ise daha çok antibiyoterapinin gelişmesi, cerrahi mikroskopların kullanılmaya başlanması ve optik aletlerdeki gelişmeler sayesinde 1950'li yıllarda hızlanmıştır. Bu yıllarda Wullstein ve Zollner isimli iki Alman cerrah perforasyon onarımında serbest deri grefti ve pediküllü deri greftini kullanmışlar ve gerçek timpanoplasti ameliyetlerinin başlangıcı olarak kabul edilen prensipleri öne sürmüşlerdir (35, 36). Yine House 1953 yılında full-thickness deri greftinin kullanılmasını önermiştir (37). Sonrasında 1956'da Zollner fasya lata, 1958'de Heerman temporal kas fasyası, 1959'da Claros-Domenech otolog periost, 1960'da Shea otolog ven greftini kullanmışlardır (4, 38, 39). Yağ grefti ilk kez 1962'de Ringerberg, tragal perikondrium ise ilk kez 1964'te Goodhill, Haris ve Brackman tarafından kullanılmıştır (40).

Akut TM perforasyonu gibi bazı durumlarda kulak zarına kâğıt yama yapılabilir. İşlem poliklinik şartlarında uygulanabilir. Diğer perforasyon onarım tekniklerine göre yatış gerektirmemesi, daha hızlı uygulanması, iş gücü kaybına yol açmaması, kolay uygulanabilirliği ve ucuz bir yöntem olması gibi üstünlükleri vardır. Golz ve ark. (41), 5 mm'den daha küçük kuru perforasyonlarda kâğıt yama yapılmasının timpanoplasti öncesi alternatif bir yöntem olabileceğini bildirmişlerdir.

Günümüzde de otolog temporal kas fasya grefti en çok kullanılan greft materyalidir. Deneyimli cerrahların elinde başarı oranı % 88-97 olarak bildirilmiştir. Bu tekniklerin yatış gerekliliği, maliyet, yetersiz teknik donanım gibi olumsuz özellikleri, perforasyon onarımında basit ve ucuz yöntemler aranmasına yöneltmektedir. 1990'lı yıllarda rekombinant DNA teknolojisinin ilerlemesiyle perforasyon alanında; polipeptid

büyüme faktörleri, mesajcı gibi davranarak hem migrasyonu hem de doku tamiriyle ilgili hücrelerin proliferasyonunu sağlayarak perforasyonun kapanmasına yardımcı olabilecekleri gösterilmiştir (42, 43). Yapılan bir çalışmada epidermal growth faktör (EGF) ve basic fibroblast growth faktör (bFGF)'ün geniş TM perforasyonunda rejenerasyon kapasitesi üzerinde etkili olup olmadığı incelenmiş. EGF ve bFGF'nin birbirlerine üstünlüğü olmadığı ve her iki ajanında rejenerasyon kapasitesini arttırdığı bulunmuştur (44). Ayrıca Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (45), TM perforasyonlarının rejenerasyon kapasitesini arttırmak için EGF ve epidermal growth faktör reseptörü (EGFR) gen salınımlı polietilenimin / kitosan yamaları geliştirmişler. Polietilenimin ilavesi, TM hücrelerinin yama üzerindeki yapışmasını ve göç yeteneğini arttırmıştır. EGF ve EGFR geninin aynı anda salınması, TM hücre proliferasyonunun, adezyon ve migrasyon kabiliyetinin daha da artmasını sağlamıştır. Sonuç olarak, geliştirilen bu yamaların, TM perforasyonlarını iyileştirdiği görülmüş ve hem kronik hem de akut TM perforasyonlarının rejenerasyonunu arttırmak amaçlı uygulanabileceği öngörülmüştür.

2.6. Timpanik Membran Yara İyileşmesi

Çeşitli nedenlerle meydana gelen TM perforasyonları, çoğu zaman zarın proliferasyon ve epitelyal migrasyon özellikleri sayesinde kendiliğinden kapanır (46). Birçok faktör zarın rejenerasyon yeteneğini olumsuz etkileyerek perforasyon kapanmasını etkilemektedir. Enfeksiyon, perforasyon büyüklüğü ve çeşidi, travma, yaş, beslenme ve immun sistem bozuklukları, topikal steroid kullanımı, yabancı cisimler gibi nedenler TM perforasyonunun spontan iyileşmesini etkiler (47).

Yara iyileşmesinde sırasıyla hemostaz, inflamasyon, proliferasyon, remodeling (yeniden şekillenme), kontraksiyon gibi evreler görülür (47). TM perforasyon iyileşmesinde ise; epitelyal çoğalma, epitelyal migrasyon, fibroblastik aktivite artışı, anjiogenezis ve doku remodeling gibi evreler görülür (48). TM yara iyileşmesinde hemostaz ve inflamasyon evreleri diğer dokulardaki yara iyileşmesi ile aynıdır. Epitelyal migrasyon ve proliferasyon evreleri ise diğer dokulardan tamamen farklıdır (49). Çoğu yara iyileşmesinde epitelizasyondan önce granülasyon oluşur ve defektin üzerini kapatarak epitelin ilerlemesine olanak sağlar. Epitelin granülasyon dokusunu örtmesinin ardından

remodeling evresi başlar ve bu evrede granülasyon dokusu matür skar dokusuna dönüşür (50). TM'da ise öncelikle skuamöz epitel proliferasyonu ile perforasyon kapatılır. Epitelizasyon ilk 48 saat içinde başlamaktadır. TM'ın malleus, anulus ve DKY kanalı gibi daha iyi kanlanması olan bölgelerinde epitelyal proliferasyon daha fazladır. Bu epitelyal proliferasyon perforasyonun santrale doğrudur ve perforasyon üzerinde ekstraselüler matriks yerine köprü oluşturur. Epitelizasyondan sonra fibröz tabaka ortaya çıkar. Yeni fibröz tabakanın yeniden şekillenmesiyle daha ince bir zar yapısı oluşur. Perforasyon alanından uzakta olan zarın sağlam kısımları ise normalden daha kalın hale gelir. Zarın perfore kısmı dışındaki sağlam bölgelerin kalınlığının artma nedeni; inflamasyonun artması sonucunda, kollajen sentezi ve fibroblastik aktivitenin artmasıdır (51-53). Bazı TM perforasyonlarının kendiliğinden iyileşmemesinin nedeni defektin çok büyük olması ve epitel proliferasyonuna bağlı köprü oluşturulamamasıdır. Kronik TM perforasyonlarına neden olan tekrarlayan enfeksiyonlar, iyileşme sürecini bölerek epitelyal proliferasyonun gerilemesine ve perforasyon halkasının çevresinde matür epitel tabakası oluşmasına neden olur (54).

Wang ve ark.'nın (55) yaptığı rat TM perforasyon iyileşmesi ile ilgili bir çalışmaya göre; TM'ın epitelyal proliferasyonu, perforasyon kenarlarından değil de, manibrium mallei ve anulustan başladığını göstermiştir. Periferde proliferen olan epitel hücreleri, perforasyonun merkezine santrale doğru ilerleyerek perforasyon kapanır. Yani normalde TM serumeni umbodan başlayıp dış kulak yoluna doğru sentrifugal migrasyonla atmaktadır. Ancak yara iyileşmesinde bu tam tersi perforasyondan santrale doğru sentripedaldir. Hasardan sonra hemostaz ve enflamasyon süreci ilk 48 saatte başlamaktadır (54).

Miringoskleroz, zarın yara iyileşme sürecinin farklı evrelerinde ortaya çıkan geri dönüşümsüz bir durumdur. Yapılan çalışmalarda perforasyon sonrası dokuzuncu saatten itibaren görülebilir. Histolojik olarak kollajen tabakada yoğun makrofaj infiltrasyonu görülür. Enflamasyonun erken döneminde makrofaj kaynaklı nitrik oksit ve diğer mediatörlerin neden olduğu doku hasarı iyileşmesi sonucu fibrozis oluşur (56).

2.7. Leptin

Yağ dokudan salgılanan protein yapıdaki maddelere adipokin denir. Bu adipokinlerden sitokin bir hormon olan leptin, multifonksiyoneldir (57). Leptinin yara iyileşmesinde etkili olduğunu gösteren birçok çalışma vardır (91-94).

2.7.1. Leptinin Tarihçesi

Leptin, Yunanca “ince” anlamına gelen “leptos” sözcüğünden türetilmiştir. 1950’lerde Kenedy tarafından vücut ağırlığını kontrol eden adipoz doku kaynaklı bir hormonun, adipoz doku oranına bağlı olarak dolaşımda bulunduğu öne sürülmüştür (58). Zhang ve ark. (59), 1994 yılında obezite ile ilişkili mutajenik gen ürünü olan ob/ob genini, mutant farelerden elde etmişlerdir.

2.7.2. Leptinin Özellikleri

Yapı olarak sitokinlere benzeyen leptin, 145-146 aminoasit uzunluğunda 16 k-Da ağırlığındadır. 4 α heliks, 2 β kırılmalı tabaka ile tek disülfid bağ içerir. N-terminal, C-terminal ve C-terminalinde bulunan disülfid köprüsünün oluşturduğu üç farklı yapıya sahiptir. Bu üç yapıdan N-terminal bölümü, biyolojik ve reseptör aktivitesinden sorumludur. C-terminal bölümü ise N-terminal bölümünün aktivitesini kontrol eder. Disülfid köprüsünün leptinin aktivitesinde önemi olmadığı bulunmuştur (60). İnsanda 7. kromozomun uzun kolundaki ob/ob geni tarafından kodlanır (61).



Şekil 5. Leptinin Yapısı (7).

Leptin; beyaz ve kahverengi yağ dokusu, hipotalamus, pituiter bez, gastrik epitelyum, iskelet kası ve sinsisyotrofoblast gibi birçok dokudan sentezlenir. Böbrekler ve karaciğer gibi diğer splanknik organlar tarafından itrah edilir (62, 63). Plazmada serbest ve proteine bağlı formu bulunur. Aktif olan serbest formudur. Yarı ömrü 20-30 dakikadır. Yemeklerden 2-3 saat sonra salgılanır. Diüurnal ritmi bulunan leptin, sabah erken saatlerde en yüksek seviyesine ulaşırken, öğleden sonra en düşük seviyelere iner (64).

Leptin etkisini hücre yüzeyinde bulunan Ob-R reseptörüne bağlanarak gösterir. Bu reseptör sitoplazmik ve transmembran bölgeleri olan sitokin reseptör ailesine aittir. Ob-R reseptörünün sitoplazmik bölgesi JAK-STAT yolağını uyaran motiflere sahiptir (65). Ob-R başta santral sinir sistemi olmak üzere birçok dokuda eksprese edilmektedir. Kalp, plasenta, akciğer, karaciğer, kas, böbrek, pankreas, dalak, timus, prostat, testis, over ve kolon leptin reseptörleri bulunan dokulardır (62, 66). Ayrıca epidermal hücrelerde de leptin reseptörleri bulunmaktadır (91).

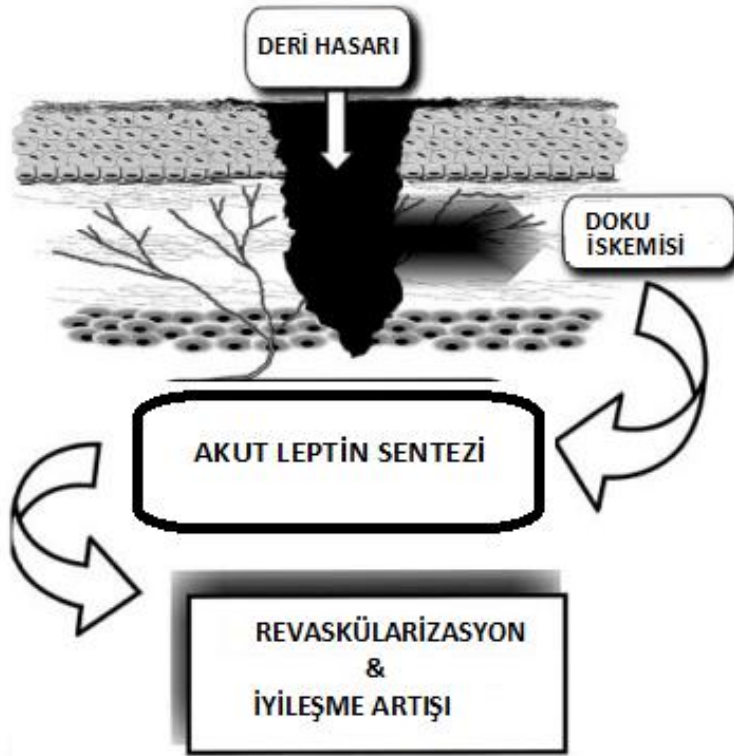
2.7.3. Leptinin Fonksiyonları

Ghreltin ve leptin birbirleri ile antagonistik çalışan iki hormondur. Hipotalamusta bulunan Y nöronları aracılığı ile feedback mekanizmaları ile kontrol edilirler ve vücut ağırlığını ayarlarlar. Bu iki hormonun düzeyleri; açlık, tokluk, cinsiyet, glukoz ve diyet, insülin, barsak hormonları, parasempatik aktivite, yaş, gebelik, obezite, cinsiyet, polikistik over sendromu, enerji düzeyi, insülin direnci ve diabetes mellitus, büyüme hormonu eksikliği, akromegali, hipo/hipertiroidizm, neonatal dönem ve bazı nöroendokrin, gastrointestinal tümörler gibi nedenlere bağlı olarak ayarlanır (62).

Esas fonksiyonu, gıda alımını düzenlemek olan leptine tokluk hormonu denir. Hipotalamusa negatif feedback mekanizması ile etki eder (67). Nöroendokrin sistemin ve metabolizmanın düzenlenmesi, puberte, üreme, hematopoez, immünite, gastrointestinal fonksiyonların düzenlenmesi, sempatik sinir sistemi aktivasyonu, anjiogenez ve osteogenezis, hafıza üzerinde çok önemli rolleri olduğu saptanmıştır (67-76).

2.7.4. Leptin ve Yara İyileşmesi

Leptin immun sisteme etkilerinden dolayı yara iyileşmesi üzerinde de etkisi vardır (72). Leptin defekti (ob/ob) veya leptin reseptör defekti (db/db) olan farelerde özellikle hücresel immunitede bozukluk olduğu tespit edilmiştir. Makrofaj fonksiyonlarında, viral ve bakteriyel enfeksiyona yanıtta azalma görülür. Leptin makrofaj aktivitesini arttırarak fagositozu güçlendirir, pro ve anti-inflamatuvar sitokin salınımını uyarır (72, 77). Leptinin yara iyileşme süresini kısalttığı ve anjiogenezi arttırdığını bildiren çalışmalar vardır (8).



Şekil 6. Leptinin proanjiogenik aktivitesi (78).

3. MATERYAL-METOD

3.1. Deney Hayvanları

Çalışma Erciyes Üniversitesi Deney hayvanları Etik Kurulu'nun "13.12.2017" tarihli "17/133" numaralı karar onayı alındıktan sonra Erciyes Üniversitesi Deneysel Klinik Araştırma Merkezi'nde üretilen, 6 aylık ve ağırlıkları 250-300 gr. arasında değişen 42 adet (84 kulak) sprague dawley cinsi erişkin dişi rat üzerinde gerçekleştirildi. Deney hayvanları Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında 12 saat aydınlık/12 saat karanlık siklusuna uyarak, sıcaklığın 21 derecede sabitlendiği, yiyecekte kısıtlama yapılmadığı (pelet yem + su), güvenli kafesler içinde barındırıldı.

42 rat daha sonra randomize olarak beş gruba ayrıldı. Bu çalışma sırasında Helsinki bildirgesindeki kurallara uyuldu.

3.2. Hayvanların Hazırlanması ve Deneysel İşlem

Hayvanlar intraperitoneal (İP) yolla verilen 40 mg/kg ketamin hidroklorür (Alfamine, Ata Fen, Türkiye) ve 10 mg/kg xyzlazine (Alfazyne, Ata Fen, Türkiye) kombinasyonu ile sedatize edildiler. Tekrarlayan anestezi dozu gerektiğinde, ilk dozun 1/3'ü kadar ketamin İP olarak uygulandı. Anestezi sonrasında, toplam 42 rata otomikroskopik (Zeiss, S1, Almanya) bakı yapıldı. DKY'na uygun spekulum yerleştirilerek DKY ve TM'ları muayene edildi. DKY'ndaki debris ve/veya buşonlar temizlendi. Dış ve orta kulak patolojisi olan rat saptanmadı.

Ratlarda, kronik TM perforasyon modeli oluşturmak için 1. günde zarın PT bölümüne pik yardımı ile perforasyon oluşturulduktan sonra 5. ve 10. günlerde perforasyon kenarlarına ucu kor haline gelinceye kadar ısıtılan pik yardımı ile termal hasar uygulanmış ve perforasyon süreleri uzatılmıştır. Perforasyon kalıcılığından emin olunduktan sonra 15. günden itibaren ilaç uygulamalarına başlandı.

42 rat daha sonra randomize olarak beş gruba ayrıldı. **A grubuna** (10 rat) topikal saline (Serum fizyolojik % 0.9, Eczacıbaşı, Türkiye), **B grubuna** (10 rat) topikal leptin

(Leptin human 1 mg flakon, SİGMA-Life Science, Almanya), **C grubuna** (10 rat) topikal fosfat tampon çözeltisi (Phosphate Buffered Saline tablet-PBS tablet, SİGMA-Life Science, Almanya), **D grubuna** (10 rat) İP leptin (Leptin human 1 mg flakon, SİGMA-Life Science, Almanya) verilmesi planlandı. **E grubu** (2 rat) sham grubu olarak belirlendi ve perforasyon sonrası madde tatbik edilmedi. Topikal ilaç uygulamalarından sonra, ilacın TM'a ulaşılabilirliğini arttırmak için ratın başı 30 saniye boyunca sabit tutuldu. Gruplar Tablo 1' de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 1. Çalışma grupları

A Grubu	10 adet yetişkin rat (20 kulak)	<i>20 µl/gün saline 3 günde bir 7 kez topikal olarak uygulandı.</i>
B Grubu	10 adet yetişkin rat (20 kulak)	<i>5 µg/gün (20 µl) leptin 3 günde bir 7 kez topikal olarak uygulandı.</i>
C Grubu	10 adet yetişkin rat (20 kulak)	<i>20 µl/gün fosfat tampon çözeltisi 3 günde bir 7 kez topikal olarak uygulandı.</i>
D Grubu	10 adet yetişkin rat (20 kulak)	<i>0.1 mg/kg/gün (0.1 ml) leptin 3 günde bir 7 kez İP yoldan verildi.</i>
E Grubu	2 adet yetişkin rat (4 kulak)	<i>Sham grubu olarak belirlendi ve madde tatbik edilmedi.</i>

Deney süresi içerisinde 1. günde anestezi sonrasında A grubu ve B grubundan birer hayvanda kayıp yaşandı ve 40 rat (80 kulak) çalışmayı tamamladı. Çalışmanın 1. gününde İP yolla verilen 40 mg/kg ketamin hidroklorür ve 10 mg/kg xylzazin kombinasyonu ile anestezi sağlandı. Rat TM'larının PT bölümüne pik yardımı ile perforasyon oluşturuldu. Oluşturulan perforasyonun devamlılığı, 5. ve 10. günlerde aynı şekilde anestezi altında, kor haline gelinceye kadar ısıtılmış pik ucunun perforasyon kenarlarına temas ettirilmesiyle sağlandı. Bu şekilde termal hasar ile kronik TM perforasyon modeli oluşturuldu. 15. gün randomize belirlenen gruplara göre ilaç uygulamasına geçildi. 15. günden itibaren, 3 günde bir olmak üzere toplam 7 kez, gruplarda belirlenen ilaç uygulamaları yapıldı. İP ilaç uygulamaları insülin enjektörü ile yapılırken, Topikal ilaç uygulamalarında mikropipet kullanıldı. Çalışmanın 35. gününde

otoendoskop ile tüm ratların TM'ları muayene edildi ve perforasyonların kapanıp kapanmadığı klinik olarak incelendi. Ardından, tüm ratlar yüksek doz İP ketamin hidroklorür-xylazin kombinasyonu ile sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen ratların temporal bullaları çıkarılarak patolojik inceleme için hazırlandı.



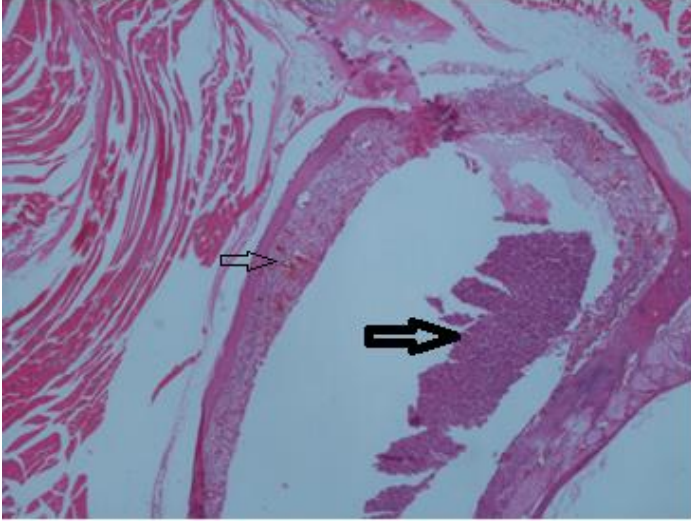
Şekil 7. Topikal uygulamada kullanılan mikropipet



Şekil 8. Çalışmanın deneysel aşamasının yapılışı

3.3. Histomorfolojik Değerlendirme

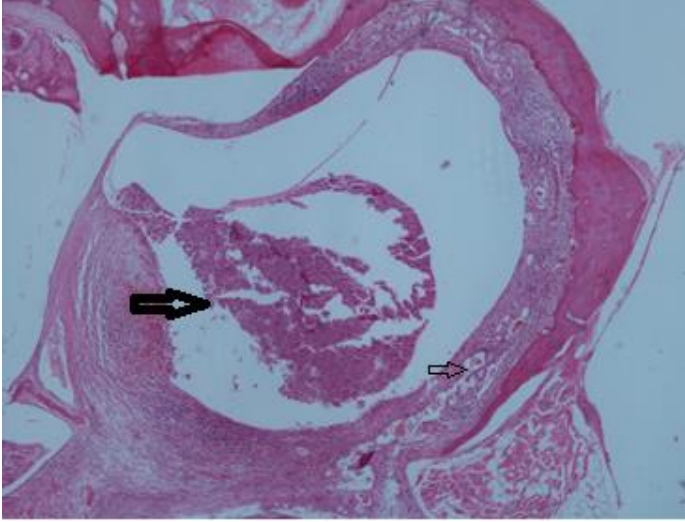
Dokular %10 formalinde fikse edildi ve parafine gömüldü. Histopatolojik inceleme için, örnekler formik asit ve sodyum sitrat çözeltisinde dekalsifiye edildi. Temporal bullalar malleusun caput brevesi boyunca ikiye bölünerek, bilateral olarak TM enine kesiti oluşturuldu. Her bir vakadan parafine gömülü bir doku bloğu seçildi ve 5 µm'lik kesitler halinde kesildi. Hematoksilen ve eozin ile boyandı ve ışık mikroskobu altında incelendi. Doku kesitleri ksilen ile deparafinize edildi ve etanol ile yıkandı. Histolojik olarak perfore TM'lar; lökosit infiltrasyonu, neovaskülarizasyon, fibroblast proliferasyonu ve subepitelyal bağ dokusunun kalınlığının karşılaştırılması açısından değerlendirildi. Histopatolojik olarak, subepitelyal bağ doku kalınlığının artışı, neovaskülarizasyon, lökosit infiltrasyonu ve fibroblast proliferasyonunun varlığı aynı patolog tarafından subjektif olarak, - (yok), + (zayıf), ++ (orta) veya +++ (şiddetli) olarak skorlandı. Subepitelyal bağ dokusunun kalınlığının artışı değerlendirilirken; - (yok)=0 µm, + (zayıf)=0-10 µm, ++ (orta)=10-20 µm, +++ (şiddetli)= 20-30 µm olarak belirlendi. Neovaskülarizasyon değerlendirilmesinde, en yoğun vasküler yapının olduğu 3 alanda 400x (40xX10x) büyütme ile sayım yapıldı. Sayım yapılırken damar yapısı gösteren hücreler ve hücre kümeleri neovaskülarizasyon olarak değerlendirildi. Preparattan alınan 3 alandaki mikrovasküler sayı toplamı verildi. Fibroblast ve lökosit infiltrasyonunda en yoğun olduğu alanda en az 500 hücre sayılarak hücre oranı hesaplandı. Sonuçlar dört basamaklı skorlama sistemine göre "0"= %0-5 oranında boyanma, "1"= %6-25 oranında boyanma, "2"= %26-75 oranında boyanma, "3"= %75'den fazla boyanan hücre şeklinde skorlandı. TM kalınlığı kantitatif olarak mikrometre cinsinden ölçüldü.



Şekil 9. Hematoksilen ve eozin ile boyalı topikal leptin verilen gruptan bir ratın TM histopatolojik görüntüsü.

Solda kas dokusu, ortada TM'ı çevreleyen çoğunluğu nötrofilden oluşan yoğun iltihabi hücre artışı mevcut. Ayrıca damarlanma ve bağ doku artışı var.

⇨ : TM üzerinde neovaskülarizasyon alanları ⇨ :nötrofiller



Şekil 10. Hematoksilen ve eozin ile boyalı İP leptin verilen gruptan bir ratın TM histopatolojik görüntüsü.

Ortada belirgin nötrofil hakimiyetinde iltihabi hücre infiltrasyonu, çevresinde TM kalınlaşması, damarlanma artışı ve ödem mevcut.

⇨ : TM üzerinde neovaskülarizasyon alanları ⇨ :nötrofiller

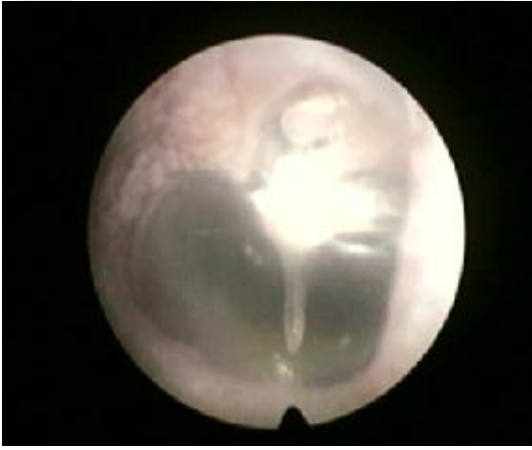
3.4. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar GraphPad Prism 7.00 (Graphad Software Inc. , CA, USA) yazılımı kullanılarak analiz edildi. Verilerin analizinde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Anlamli olduğu durumda çoklu karşılaştırma amaçlı Dunn post-hoc testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ değeri anlamli olarak kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

Çalışmanın deney aşaması 5 Nisan 2018 – 9 Mayıs 2018 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Deneysel Klinik Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Toplam 42 adet yetişkin dişi rat (84 kulak), A, B, C, D ve E grupları olmak üzere randomize 5 gruba ayrıldı. Deney aşamasında 1. günde anestezi sonrasında A ve B grubundan birer hayvanda kayıp yaşandı. Çalışma toplam 40 rat (80 kulak) ile tamamlandı. Gruplar çalışma sonunda 35. gün otoendoskop ile klinik olarak muayene edildi. Muayenede C grubundaki bir TM ve E grubundaki bir TM haricindeki tüm TM perforasyonlarının klinik olarak kapandığı görüldü.

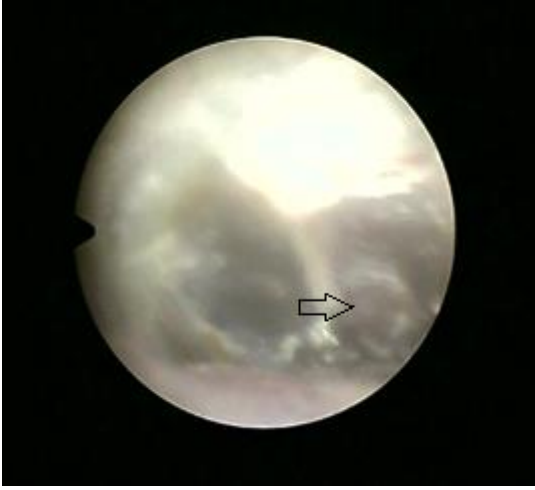


Şekil 11. Normal rat TM otoendoskopik görüntüsü



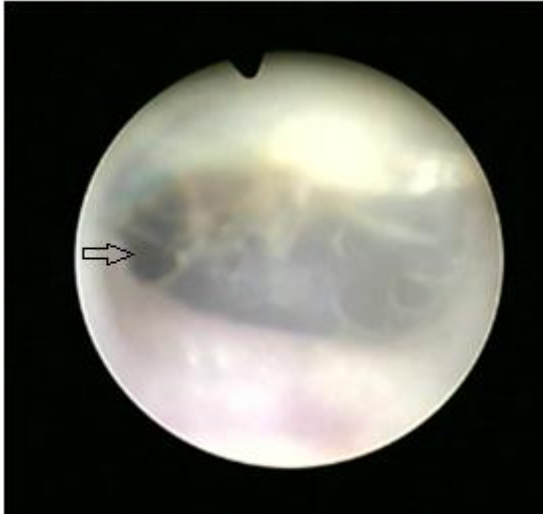
Şekil 12. PT bölümüne perforasyon yapılan rat TM otoendoskopik görüntüsü

⇒ : perforasyon



Şekil 13. Topikal leptin verilen gruptan bir ratın çalışma bitimindeki TM otoendoskopik görüntüsü

⇒ : perforasyonun kapandığı alan



Şekil 14. Topikal olarak fosfat tampon çözeltisi verilen gruptan bir ratın çalışma bitiminde perfore kalan TM otoendoskopik görüntüsü

⇒ : perforasyonun kapandığı alan



Şekil 15. İP leptin verilen gruptan bir ratın çalışma bitimindeki TM otoendoskopik görüntüsü

⇒ : perforasyonun kapandığı alan



Şekil 16. Topikal salin verilen gruptan bir ratın çalışma bitimindeki TM otoendoskopik görüntüsü

⇒ : perforasyonun kapandığı alan



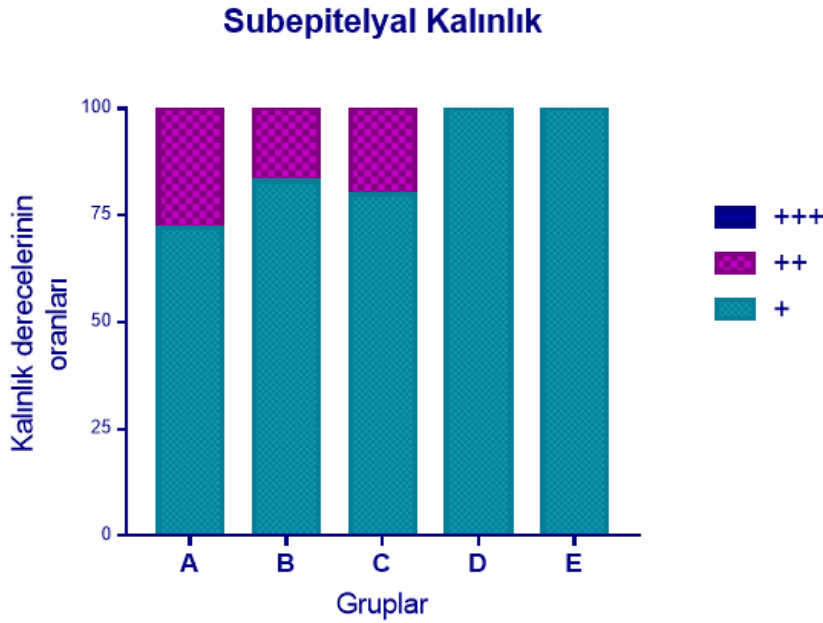
Şekil 17. Sham grubundan bir ratın çalışma bitiminde perfore kalan TM otoendoskopik görüntüsü

⇨ : perforasyon

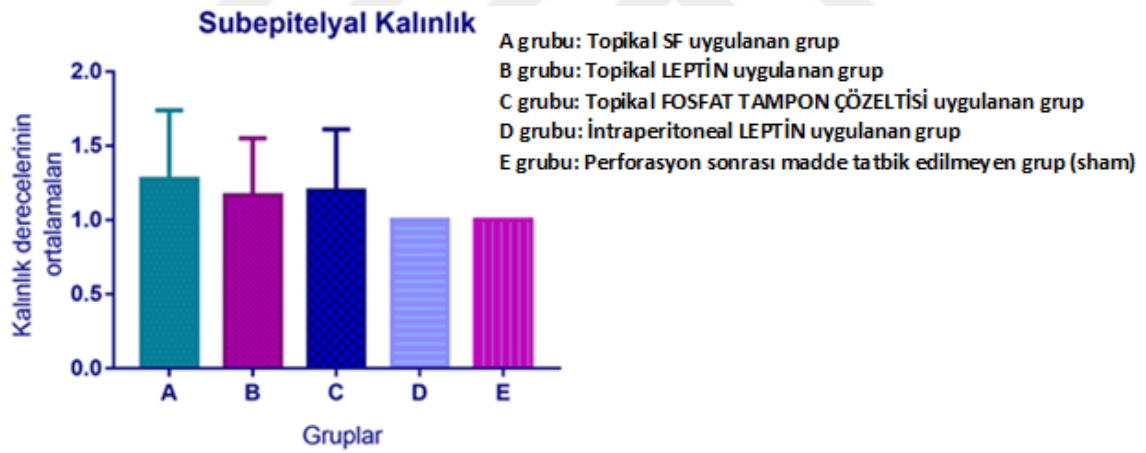
Klinik olarak muayene edilen tüm ratlar muayene sonrası sakrifiye edilerek, temporal bullaları histopatolojik inceleme için çıkarıldı ve TM'ları subepitelyal kalınlık, fibroblast proliferasyonu, lökosit infiltrasyonu ve neovaskülarizasyon dereceleri açısından sırasıyla incelendi. TM kalınlıkları mikrometre cinsinden kantitatif olarak ölçüldü.

4.1. Subepitelyal Kalınlık

Çalışma grupları subepitelyal kalınlık derecelerinin oranları açısından incelendiğinde; A grubundaki toplam 9 ratın 18 kulağının, 13'ünde (%72) zayıf subepitelyal kalınlık derecesi görülürken, 5'inde (%28) orta derecede kalınlık görüldü. B grubundaki 9 ratın 18 kulağının, 15'inde (%83) zayıf subepitelyal kalınlık derecesi görülürken, 3'ünde (%17) orta derecede kalınlık görüldü. C grubundaki 10 ratın 20 kulağının, 16'sında (%80) zayıf subepitelyal kalınlık derecesi görülürken, 4'ünde (%20) orta derecede kalınlık görüldü. D grubundaki 10 ratın 20 kulağının, tamamında (%100) zayıf subepitelyal kalınlık derecesi mevcuttu. E grubundaki 2 ratın 4 kulağının, tamamında (%100) aynı şekilde zayıf subepitelyal kalınlık derecesi mevcuttu. Grupların hiçbirinde şiddetli subepitelyal kalınlık derecesi görülmedi. Subepitelyal kalınlık derecelerinin oranları aşağıda Şekil 18'de gösterilmiştir.



Şekil 18. Subepitelyal kalınlık derecelerinin oranlarını gösteren grafik



Şekil 19. Subepitelyal kalınlık derecelerinin ortalama değerlerini gösteren grafik

A grubunun subepitelyal kalınlık derecelerinin ortalaması 1.278 ± 0.4609 idi. B grubunun subepitelyal kalınlık derecelerinin ortalaması 1.167 ± 0.3835 iken, C grubunun subepitelyal kalınlık derecelerinin ortalama değeri 1.2 ± 0.4104 olarak bulundu. D ve E grubunun subepitelyal kalınlık derecelerinin ortalaması 1 olarak bulundu. Subepitelyal kalınlık derecelerinin oranları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$). Grupların subepitelyal kalınlık derecelerinin ortalama değerleri Tablo 2’de verilmiştir.

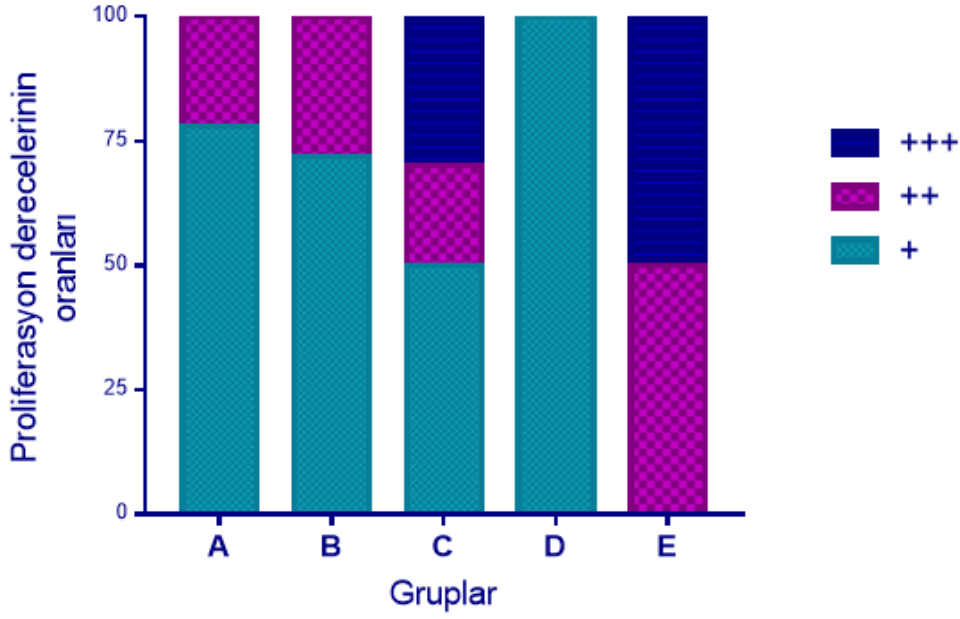
Tablo 2. Subepitelyal kalınlık derecelerinin ortalama değerleri

Gruplar	A	B	C	D	E
Örnek Sayısı	18	18	20	20	4
Ortalama	1.278	1.167	1.2	1	1
Standart Sapma	0.4609	0.3835	0.4104	0	0
Ortalamanın Standart Hatası	0.1086	0.09039	0.09177	0	0

4.2. Fibroblast Proliferasyonu

Tüm gruplar fibroblast proliferasyon derecelerinin oranları açısından incelendiğinde (Şekil 20); A grubundaki 9 ratın 18 kulağının, 14'ünde (%78) zayıf fibroblast proliferasyonu görülürken, orta derecede fibroblast proliferasyonu görülen 4 kulak (%22) mevcuttu. B grubundaki 9 ratın 18 kulağının 13'ünde (%72) zayıf fibroblast proliferasyonu görülürken, 5'inde (%28) orta derecede fibroblast proliferasyonu görüldü. C grubundaki 10 ratın 20 kulağının, 10'unda (%50) zayıf fibroblast proliferasyonu görülürken, 4'ünde (%20) orta derecede, 6'sında (%30) şiddetli fibroblast proliferasyonu görüldü. D grubundaki 10 ratın 20 kulağının tamamında (%100) zayıf fibroblast proliferasyonu görüldü. E grubundaki 2 ratın 4 kulağının, 2'sinde (%50) orta derecede, 2'sinde (%50) ise şiddetli fibroblast proliferasyonu görüldü.

Fibroblast Proliferasyonu

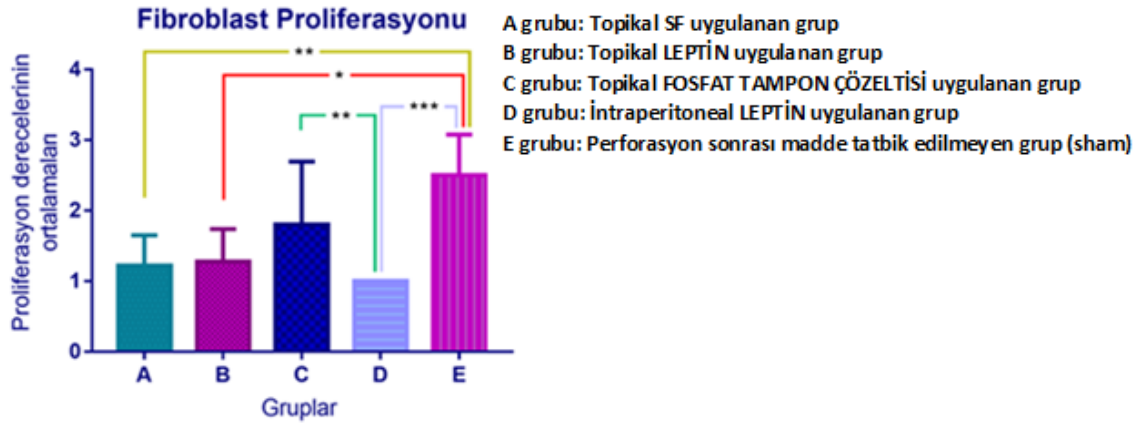


Şekil 20. Fibroblast proliferasyon derecelerinin oranlarını gösteren grafik

Gruplar kendi aralarında Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırıldı (Tablo 3, Şekil 21). E grubunun fibroblast proliferasyon derecelerinin oranı, B grubuna göre anlamlı oranda artmış olarak izlendi ($p=0.0186$). E grubunun fibroblast proliferasyon derecelerinin oranı, A grubuna göre anlamlı oranda artmış olarak izlendi ($p=0.0094$). C ve D grupları fibroblast proliferasyonu derecelerinin oranları açısından kıyaslandığında C grubunun ortalama değerleri, D grubuna göre anlamlı oranda artmış olarak izlendi ($p=0.0024$). Gruplar arasında en anlamlı ilişki D ve E grubu arasında saptandı. E grubunun fibroblast proliferasyon derecelerinin oranları D grubuna göre anlamlı oranda artmış olarak izlendi ($p=0.0004$).

Tablo 3. Çalışma gruplarının fibroblast proliferasyonu açısından istatistiksel olarak birbirleri ile karşılaştırılması

Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi	Sıra Ortalaması Farkı	Düzeltilmiş P Değeri
A-B	-2	>0.9999
A-C	-13.45	0.2489
A-D	8	>0.9999
A-E	-33.75	0.0094 *
B-C	-11.45	0.5620
B-D	10	0.9538
B-E	-31.75	0.0186 *
C-D	21.45	0.0024 **
C-E	-20.3	0.4463
D-E	-41.75	0.0004 ***



Şekil 21. Fibroblast proliferasyon derecelerinin ortalama değerlerini gösteren grafik

Çalışma gruplarının fibroblast proliferasyon derecelerinin ortalama değerleri Tablo 4'te verilmiştir. Gruplardan; A grubunun fibroblast proliferasyon derecelerinin değerleri 1.222 ± 0.4278 iken, B grubunun fibroblast proliferasyon derecelerinin değerleri 1.278 ± 0.4609 idi. C grubunun fibroblast proliferasyon derecelerinin değerleri

1.8±0.8944, D grubunun fibroblast proliferasyon derecelerinin değerleri 1, E grubunun fibroblast proliferasyon derecelerinin değerleri ise 2.5±0.5774 idi.

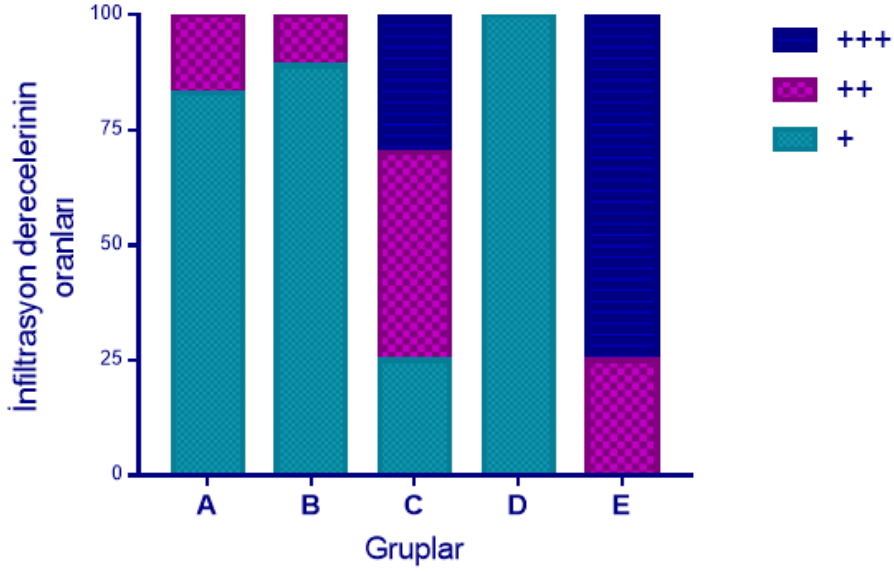
Tablo 4. Fibroblast proliferasyon derecelerinin ortalama değerleri

Gruplar	A	B	C	D	E
Örnek Sayısı	18	18	20	20	4
Ortalama	1.222	1.278	1.8	1	2.5
Standart Sapma	0.4278	0.4609	0.8944	0	0.5774
Ortalamanın Standart Hatası	0.1008	0.1086	0.2	0	0.2887

4.3. Lökosit İnfiltrasyonu

Lökosit infiltrasyonu için gruplar değerlendirildiğinde (Şekil 22); A grubundaki 9 ratın 18 kulağının, 15'inde (%83) zayıf lökosit infiltrasyonu görülürken, 3'ünde (%17) orta derecede lökosit infiltrasyonu görüldü. B grubundaki 9 ratın 18 kulağının, 16'sında (%89) zayıf lökosit infiltrasyonu görülürken, 2'sinde (%11) orta derecede lökosit infiltrasyonu görüldü. C grubundaki 10 ratın 20 kulağının, 4'ünde (%25) zayıf lökosit infiltrasyonu, 10'unda (%45) orta derecede lökosit infiltrasyonu ve son olarak 6 kulakta (%30) şiddetli lökosit infiltrasyonu görüldü. D grubundaki 10 ratın 20 kulağının tamamında (%100) zayıf lökosit infiltrasyonu izlendi. E grubundaki 2 ratın 4 kulağının 1'inde (%25) orta derecede lökosit infiltrasyonu, 3'ünde (%75) şiddetli lökosit infiltrasyonu görüldü.

Lökosit İnfiltrasyonu

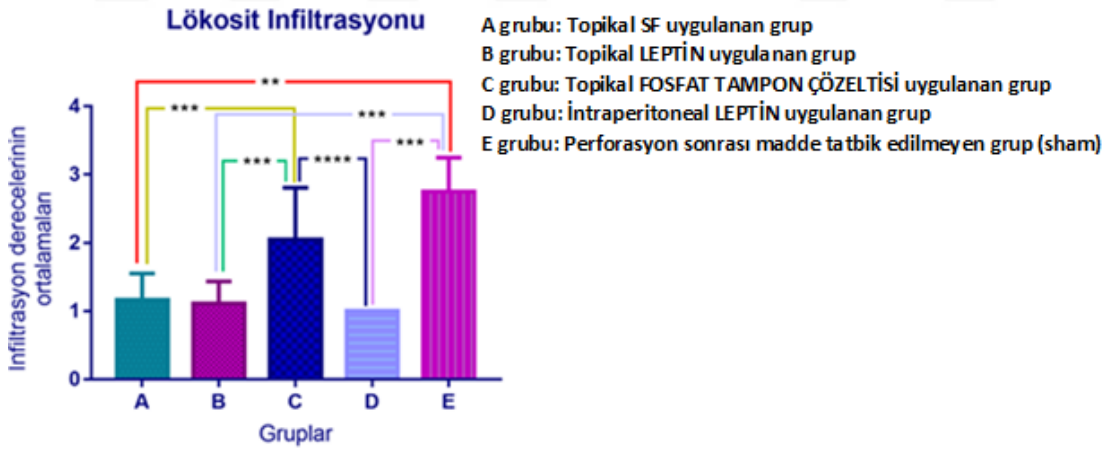


Şekil 22. Lökosit infiltrasyon derecelerinin oranlarını gösteren grafik

Gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında (Tablo 5, Şekil 23); E grubunun lökosit infiltrasyon oranı, A grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p=0.0019$). C grubunun lökosit infiltrasyon oranı, A grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p=0.0006$). C grubunun lökosit infiltrasyon oranı, B grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p=0.0002$). E grubunun lökosit infiltrasyon oranı, B grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p=0.0009$). E grubunun lökosit infiltrasyon oranı, D grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p=0.0001$). C grubunun lökosit infiltrasyon oranı, D grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p<0.0001$).

Tablo 5. Çalışma gruplarının lökosit infiltrasyonu açısından istatistiksel olarak birbirleri ile karşılaştırılması

Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi	Sıra Ortalaması Farkı	Düzeltilmiş P Değeri
A-B	1.972	>0.9999
A-C	-24.31	0.0006 ***
A-D	5.917	>0.9999
A-E	-38.58	0.0019 **
B-C	-26.28	0.0002 ***
B-D	3.944	>0.9999
B-E	-40.56	0.0009 ***
C-D	30.23	<0.0001 ****
C-E	-14.28	>0.9999
D-E	-44.5	0.0001 ***



Şekil 23. Lökosit infiltrasyon derecelerinin ortalama değerlerini gösteren grafik

Çalışma gruplarının lökosit infiltrasyon derecelerinin ortalama değerleri Tablo 6'da verilmiştir. Gruplardan A grubunun lökosit infiltrasyon oranı 1.167 ± 0.3835 , B grubunun lökosit infiltrasyon oranı 1.111 ± 0.3234 , C grubunun lökosit infiltrasyon oranı

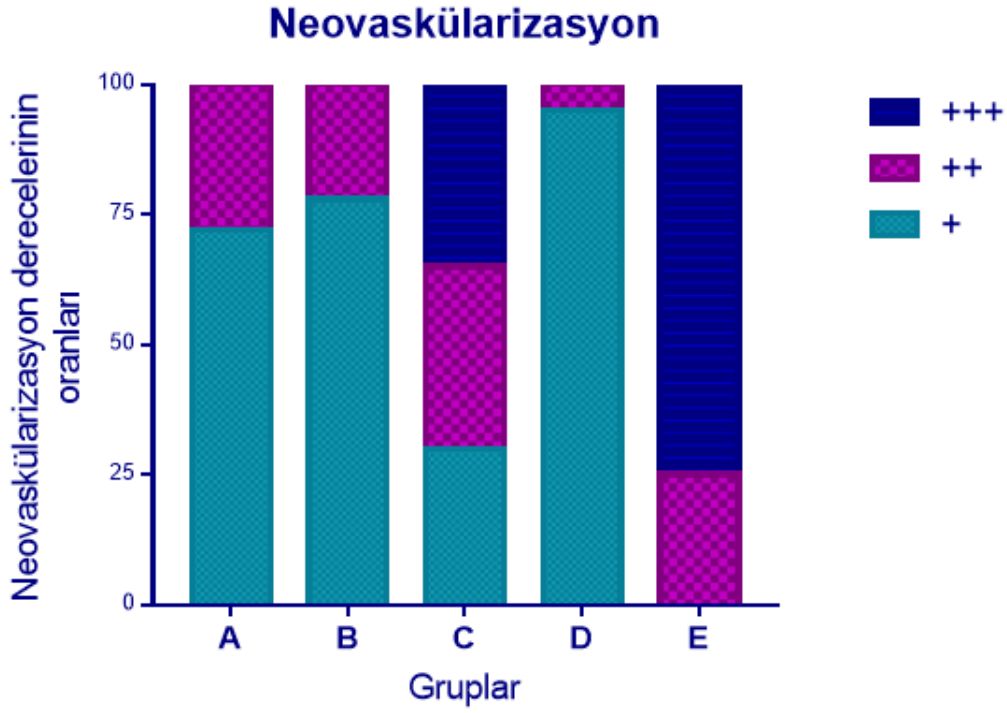
2.05±0.7592 olarak bulundu. D grubunun lökosit infiltrasyon oranı 1 iken, E grubunun lökosit infiltrasyon oranı 2.75±0.5 olarak bulundu.

Tablo 6. Lökosit infiltrasyon derecelerinin ortalama değerleri

Gruplar	A	B	C	D	E
Örnek Sayısı	18	18	20	20	4
Ortalama	1.167	1.111	2.05	1	2.75
Standart Sapma	0.3835	0.3234	0.7592	0	0.5
Ortalamanın Standart Hatası	0.09039	0.07622	0.1698	0	0.25

4.4. Neovaskülarizasyon

Neovaskülarizasyon derecelerinin oranlarının gruplar arasında karşılaştırıldığında (Şekil 24), A grubundaki 9 ratın 18 kulağının, 13'ünde (%72) zayıf neovaskülarizasyon görülürken, 5'inde (%28) orta derecede neovaskülarizasyon görüldü. B grubundaki 9 ratın 18 kulağının, 14'ünde (%78) zayıf neovaskülarizasyon görülürken, 4'ünde (%22) orta derecede neovaskülarizasyon görüldü. C grubundaki 10 ratın 20 kulağının, 6'sında (%30) zayıf, 7'sinde (%35) orta derecede, son olarak 7 kulakta (%35) şiddetli neovaskülarizasyon görüldü. D grubundaki 10 ratın 20 kulağının 19'unda (%95) zayıf, 1'inde (%5) orta derecede neovaskülarizasyon görüldü. E grubundaki 2 ratın 4 kulağının 1'inde (%25) orta derecede, 3'ünde (%75) şiddetli neovaskülarizasyon görüldü.

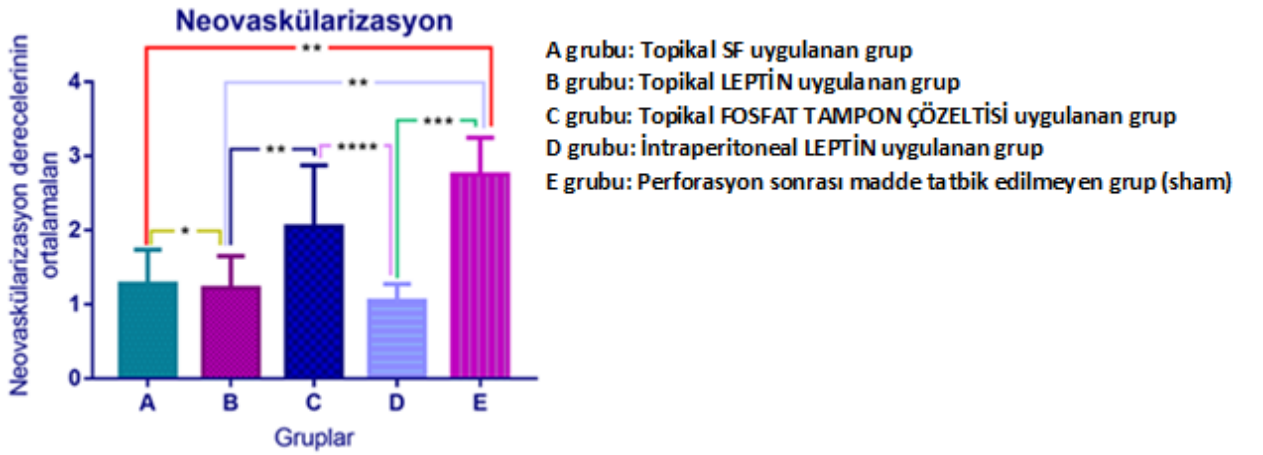


Şekil 24. Neovaskülarizasyon derecelerinin oranlarını gösteren grafik

Gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında (Tablo 7, Şekil 25), C grubunun neovaskülarizasyon derecelerinin oranı A grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p=0.0201$). E grubunun neovaskülarizasyon derecelerinin oranı, A grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak bulundu ($p=0.0096$). C grubunun neovaskülarizasyon derecelerinin oranı, B grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p=0.0069$). E grubunun neovaskülarizasyon derecelerinin oranı, B grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p=0.005$). E grubunun neovaskülarizasyon derecelerinin oranı, D grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p=0.0005$). C grubunun neovaskülarizasyon derecelerinin oranı, D grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak izlendi ($p<0.0001$).

Tablo 7. Çalışma gruplarının neovaskülarizasyon açısından istatistiksel olarak birbirleri ile karşılaştırılması

Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi	Sıra Ortalaması Farkı	Düzeltilmiş P Değeri
A-B	1.944	>0.9999
A-C	-19.68	0.0201 *
A-D	7.972	>0.9999
A-E	-35.78	0.0096 **
B-C	-21.62	0.0069 **
B-D	6.028	>0.9999
B-E	-37.72	0.005 **
C-D	27.65	<0.0001 ****
C-E	-16.1	>0.9999
D-E	-43.75	0.0005 ***



Şekil 25. Neovaskülarizasyon derecelerinin ortalama değerlerini gösteren grafik

Tablo 8’de neovaskülarizasyon derecelerinin ortalama değerleri, standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir. A grubunda neovaskülarizasyon derecelerinin oranı 1.278 ± 0.4609 iken, B grubunda 1.222 ± 0.4278 olarak bulundu. C grubunda neovaskülarizasyon

derecelerinin oranı 2.05 ± 0.8256 , D grubunda 1.05 ± 0.2236 , E grubunda ise 2.75 ± 0.5 olarak bulundu.

Tablo 8. Neovaskularizasyon derecelerinin ortalama değerleri

Gruplar	A	B	C	D	E
Örnek Sayısı	18	18	20	20	4
Ortalama	1.278	1.222	2.05	1.05	2.75
Standart Sapma	0.4609	0.4278	0.8256	0.2236	0.5
Ortalamanın Standart Hatası	0.1086	0.1008	0.1846	0.05	0.25

4.5. Timpanik Membran Kalınlıkları

Grupların TM kalınlıklarının ortalama değerleri sırasıyla; A grubunda 15.39 ± 5.359 μm (10-26 μm), B grubunda 14.39 ± 5.863 μm (9-29 μm), C grubunda 14.45 ± 5.463 μm (9-27 μm), D grubunda 12.05 ± 1.986 μm (9-15 μm), E grubunda ise 14.75 ± 0.5 μm (14-15 μm) idi. Grupların TM kalınlıklarının ortalama değerleri birbirleri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$).

Tablo 9. Timpanik membran kalınlıklarının ortalama değerleri

Gruplar	A	B	C	D	E
Örnek Sayısı	18	18	20	20	4
Ortalama	15.39	14.39	14.45	12.05	14.75
Standart Sapma	5.359	5.863	5.463	1.986	0.5
Ortalamanın Standart Hatası	1.263	1.382	1.221	0.4441	0.25

5. TARTIŞMA

TM perforasyonları sık görülen bir sağlık sorunu olmasına rağmen, klinik olarak insidansı net olarak bilinmemektedir. Enfeksiyon, çarpmalar, delici travmalar, barotravmalar (hiperbarik oksijen tedavisi), akustik travmalar ve iatrojenik travmalar (miringotomi ve ventilasyon tüpü takılması, kulak kanalından serumenin temizlenmesi, kulak lavajı) TM perforasyon nedenleri arasında yer alır (2). Travmatik perforasyonlar büyük oranda kendiliğinden kapanırken; doku kaybı, enfeksiyon gibi faktörler perforasyon devamlılığına neden olarak kalıcı perforasyon oluştururlar (3).

TM perforasyonu akut otitis medianın en sık görülen sekolidir. Akut otitis medianın süpürasyon evresinde, timpanomastoid kavitede toplanan ve östaki borusunun tıkanması ile drene olamayan effüzyonun etkisi ile TM kendiliğinden delinir. Oluşan perforasyonlar genellikle zarın PT bölümündedir ve küçüktür (10). Perforasyonların çoğunluğu kendiliğinden kapanmakla beraber; yetersiz antibiyotik tedavisi, bağışıklık sistemi bozuklukları gibi nedenlerle enfeksiyonun persistan hale gelmesiyle perforasyon kalıcı olur. Bu durum akut enfeksiyon durumunun kronik bir sürece girmesine zemin hazırlar. Kronik enfeksiyon süreci ise; işitme kaybı, kulak akıntısı ve daha birçok komplikasyonu beraberinde getirerek kişinin yaşam kalitesini önemli derecede etkilemektedir. TM perforasyonu deneysel çalışmalarında akut modeller yıllarca perfore kalan kronik otit vakalarının tedavisini temsil etmediğinden az kabul görmüş ve çalışmaların seyrini kronik modeller üzerine yönlendirerek objektivite açısından insan kulağının esas tedavisine ışık tutar hale getirilmeye çalışılmıştır. Hayvanlarda kronik TM perforasyon modeli oluşturmak amacıyla, içe katlama tekniği, termal hasar, tekrarlayan miringotomiler, topikal kimyasal ajan uygulamaları ve topikal büyüme faktör inhibitör uygulamaları gibi yöntemler kullanılmıştır (79). Ratlarda travmatik TM perforasyon iyileşmesinin değerlendirildiği bir çalışmada, TM'lar malleusun anterior ve posterior kadranlarından perfore edilerek travma sonrası 3. gün 5 TM, 5. gün 5 TM, 7. gün 5 TM, 10. gün 3 TM ve 14. gün 4 TM hematoksilen-eozin boyama sonrası histopatolojik olarak değerlendirilmiş. TM perforasyon kapanmasının 7-10 gün sonra olduğu, tam iyileşmenin 14. günde tamamlandığı tespit edilmiştir. Dış epitel tabakasının proliferasyonu malleus handle ve timpanik annulusa kadar uzanmış. TM spontan iyileşmesinin, dış epitel tabakasından başlayarak LP ve mukoza tabakasının

iyileşmesi ile devam ettiği bulunmuştur (80). Literatürdeki çalışmalarda, kronik TM perforasyonu oluşturmak için, hayvan TM'larının santral bölgelerinde termal koter yardımı ile perforasyon oluşturulmuş. TM'lar 2 hafta boyunca gözlemlenmiş ve 2 hafta sonunda 3-5 mm çapında perforasyon devamlılığı sağlanacak şekilde tekrar TM'lara termal koter ile hasar uygulanmış. İkinci termal hasar uygulamasından sonra 6. haftada TM'lar muayene edilmiş. Perforasyonu devam eden ve kuru kalan TM'lar kronik TM perforasyonu modeli için kabul edilmiştir (81, 82). Çalışmamızda uygulama kolaylığı açısından termal hasarla kronik TM perforasyonu modeli oluşturduk. Literatürdeki TM perforasyonu iyileşme süreleri de göz önünde bulundurularak TM'lar PT kısmından perfore edildikten sonra 5. ve 10. günlerde perforasyon kenarlarına termal hasar uygulanarak perforasyon devamlılığı sağlandı. Perforasyon kalıcılığından emin olunduktan sonra 15. günden itibaren ilaç uygulamalarına başlandı.

Yara iyileşmesi hemostaz, inflamasyon, proliferasyon, remodeling (yeniden şekillenme), kontraksiyon gibi evrelerden oluşan kompleks bir olaydır (54). TM perforasyonu iyileşmesinde ise; epitelyal çoğalma, epitelyal migrasyon, fibroblastik aktivite artışı, anjiogenezis ve doku remodeling gibi evreler görülür (48). TM perforasyonu iyileşmesi çalışmalarında objektif kriterlere gerek duyulmaktadır. Somers ve ark. (83), santral TM perforasyonu olgularda yaptıkları histopatolojik çalışmalarda; inflamasyon (%97), fibrozis (%97), timpanoskleroz (%80), epitelyal hiperplazi (%82), epitelyum içe doğru büyümesi (%30), kulak zarı kalınlığının artması (%73), epitelyum inklüzyon kisti oluşumu (%7) gibi bulgular saptamışlardır. Çalışmamızda inflamasyon varlığı; lökosit infiltrasyonu, fibroblast proliferasyonu gibi parametreler yardımı ile histopatolojik olarak değerlendirilerken, Somers ve ark.'nın raporladığı diğer parametreler değerlendirilmemiştir. Wang ve ark.'nın (84) 50 erkek rat ile yaptığı çalışmada, 40 rat VT tatbik edilerek 14 gün boyunca İT mitomisin C ve deksametazon uygulanmış ve kronik TM perforasyonu modeli oluşturulmuş. 14., 17. günler ve 3., 4., 6., 8., 10. haftalarda sakrifiye edilerek TM'ları incelenmiş. 5 rat normal TM grubuna dahil edilmiş ve ilk gün sakrifiye edilerek TM'ları incelenmiş. 5 rat ise akut TM perforasyonu grubuna alınmış ve 3 gün sonra sakrifiye edilerek TM'ları incelenmiş. Histolojik muayenede, normal TM ve akut TM perforasyonu grupları karşılaştırıldığında, perforasyonu kenarlarını çeviren kalınlaşmış tabakalı skuamöz epitelyum, keratin ve

kolajen birikiminde belirgin artış, artmış makrofaj infiltrasyonu ve azalmış hücresel proliferasyon görülmüş. Çalışmanın histolojik sonuçlarına dayanarak, kronik TM perforasyonlarının progresif gelişimi, artan epidermal kalınlaşma, kolajen ve keratin birikmesi, makrofaj infiltrasyonu ve hücresel proliferasyonun azalması ile ilişkili bulunmuştur. Çalışmaların ışığında; biz de çalışmamızda rat TM perforasyon iyileşmesini değerlendirmek için, tüm gruplardaki TM'ları subepitelyal kalınlık, lökosit infiltrasyonu, fibroblast proliferasyonu, neovaskülarizasyon gibi histopatolojik parametreler yönünden inceledik. Histopatolojik olarak bu parametreler subjektif olarak – (yok), + (zayıf), ++ (orta), +++ (şiddetli) olarak skorlandı. Topikal leptin verilen grubun %83'ünde zayıf subepitelyal kalınlık derecesi görülürken, %17'sinde orta derecede kalınlık görüldü. İP leptin grubunun ise tamamında zayıf subepitelal kalınlık derecesi görüldü. İP ve/veya topikal leptin verilen gruplarda şiddetli subepitelyal kalınlık derecesi saptanmadı. Subepitelyal kalınlık derecelerinin oranları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$).

TM perforasyonları işitme kaybı ve kronik enfeksiyon gibi nedenlerle hayat kalitesi açısından önem arz etmektedir. TM perforasyonlarının cerrahi tedavisi; ekonomik nedenler, morbidite ve medikolegal problemler nedeniyle medikal tedavileri gündeme getirmektedir. Bu nedenle insan üzerinde yara iyileşmesini artırıcı fitoterapi uygulamaları, ototoksisite ve etik durumlar açısından problem teşkil edeceğinden, deneysel hayvan çalışmaları ön plana çıkmaktadır. Akut TM perforasyon olgularında poliklinik şartlarında kâğıt ile yama maliyet-etkin sonuçlar verebilmektedir (41). Fasya lata, temporal kas fasyası, otolog periost, otolog ven, yağ gibi greftler de TM perforasyon cerrahi onarımında kullanılabilir (40). Rekombinant deoksiribonükleik asit (DNA) teknolojisindeki ilerlemelerle birlikte; perforasyon alanındaki büyüme faktörlerinin, migrasyonu ve hücre proliferasyonunu sağlayarak perforasyonun kapanmasında etkili olabilecekleri belirtilmiştir (42, 43). Lou ve ark.'nın yaptığı çalışmada (44), EGF ve bFGF'nin TM perforasyonunda rejenerasyon kapasitesi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Lee ve ark. (45), EGF ve EGFR gen salınımlı polietilenimin / kitosan yamalarının; TM'nin hücre proliferasyonu, adezyonu ve migrasyon kabiliyetini arttırdıklarını göstermişlerdir.

Santa Maria ve ark.'nın (85) yaptığı çalışmada, ratlarda TM perforasyonunda keratinosit growth faktör-1 (KGF1), fibroblast growth faktör-2 (FGF2) ve FGF10 gibi büyüme faktörlerinin düzeylerini incelemişler. Perforasyondan 24-48 saat sonra orta kulak mukozasında FGF2 ve perforasyon çevresinde inflamatuvar hücreler görülmeye başlanmış. Çalışmada transkripsiyon faktörlerinin seviyesinde 3.-5. günlerde pik görülmüş. Malleus çevresindeki keratinosit tabakasında, travmadan 12 saat sonra başlayıp perforasyon kapanıncaya kadar devam eden FGF2 düzeyleri saptanmış. Böylece FGF2'nin perforasyon kapanması için keratinosit göçünde önemli bir rolü olduğu bulunmuş. KGF1'in ise konnektif doku ve fibroblastta, travma sonrası 12.saatte ve 3. günde pik yaptığı görülmüş. Tüm bu gelişmeler; TM perforasyon onarımında, bFGF, EGF, platelet derived growth faktör (PDGF), transforming growth faktör (TGF) gibi birçok büyüme faktörünün kullanılabileceğinin zeminini hazırlamıştır (46, 85). Mondain ve ark.'nın (51) 7 erişkin ratla yaptığı çalışmada, ratların bir kulakları perfore edildikten sonra intratimpanik (İT) olarak bFGF tatbiki yapılmış. Karşı kulaklarına ise kontrol grubu için, plasebo olarak İT sodyum klorid ve benzalkonyum klorid verilmiş. Ratlar perforasyon sonrası 1., 3., 5., 7. ve 10. günlerde sakrifiye edilerek temporal bullaları çıkarılmış ve histolojik çalışma için hazırlanmış. Tedavi edilen ve edilmeyen grup arasında TM iyileşmesinin histolojik bulguları arasında çarpıcı bir bulguya rastlanmamış. Başlangıç olarak perforasyon kenarlarında retraksiyon görülürken, sonrasında epitelyal hiperplazi ve bağ doku artışı görülmüş. Bağ dokusu içinde neovaskülarizasyon alanları bulunmuş. Perforasyon kapanması, kontrol grubunda 7. günde saptanırken, İT olarak bFGF verilen grupta kapanmanın muhtemelen 6. günde olduğu düşünülmüş. Bizim çalışmamızda topikal leptin verilen grubun %78'inde zayıf neovaskülarizasyon görülürken, %22'sinde orta derecede neovaskülarizasyon görüldü. İP leptin verilen grubun %95'inde zayıf, %5'inde orta derecede neovaskülarizasyon görüldü. Dolayısı ile çalışmamızda, İP ve/veya topikal leptin grubunda diğer çalışmalardaki gibi neovaskülarizasyon alanları olmasına rağmen; topikal olarak fosfat tampon çözeltisi verilen grubun ve sham grubunun neovaskülarizasyon derecelerinin oranları, topikal leptin ve İP leptin verilen grubun neovaskülarizasyon oranlarından istatistiksel olarak anlamlı olarak artmış olarak izlendi (Tablo 7, Şekil 25). Çalışmamızdaki bu bulgulara göre leptinin TM perforasyon iyileşmesinde neovaskülarizasyonu azalttığını söyleyebiliriz.

Dere ve ark. (86), 14 kobay üzerinde travmatik TM perforasyonun bFGF etkisini histolojik olarak değerlendirmişler. Birinci grupta perfore TM'lara lokal olarak üç ayrı dozda bFGF verilirken, ikinci grupta lokal olarak tek doz bFGF verilmiş. Tüm hayvanların sol kulakları kontrol grubu olarak belirlenmiş. Işık mikroskopi ile incelemede, çalışma gruplarında TM'lar daha kalın bulunmuş ve epitelyal tabakalarda hiperplazi mevcutmuş. Böylece, bFGF'nin epitelyal ve bağ dokusunun iyileşme sürecini arttırdığı ve bFGF'nin TM'ın atrofik şekilde iyileşmesine engel olabileceği sonucuna varılmıştır. Eken ve ark.'nın yaptığı çalışmada (87), topikal insülin uygulanan akut TM perforasyonu üzerindeki ekisi klinik olarak ve TM kalınlığı, fibroblastik reaksiyon, neovaskülarizasyon ve kollajenizasyonun histolojik olarak incelenmesi ile değerlendirilmiş. 24 sağlıklı kobayın her iki kulağına 2 mm çapında perforasyon oluşturulduktan sonra günlük sağ kulaklarına topikal olarak insülin, sol kulaklarına ise topikal olarak saline solüsyonu uygulanmış. İlaç uygulamaları tüm perforasyonlar kapanana kadar devam etmiş. Hayvanlar birinci, üçüncü, beşinci ve yedinci günlerde otomikroskopi ile değerlendirilmiş. Hayvanlar TM perforasyonundan sonra 3. ve 7. günde derin anestezi altında dekapitasyonla sakrifiye edilmiş ve histopatolojik incelemede epitel ve mukozal tabakaları incelenmiş. Parmaksı çıkıntılar, LP'nın ödemi, LP'nın neovaskülarizasyonu, LP'nın fibroblastik aktivitesi, LP'da inflamatuvar hücre varlığı ve LP'nın kollajenizasyon oranları değerlendirilmiş. Çalışma grubunda; LP fibroblastik reaksiyon pozitifliği ve LP kollajenizasyon pozitifliği kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuş. Kontrol grubu ve deney grubunda perforasyon alanında ve perfore olmayan TM bölgesinde ortalama TM kalınlık ölçümleri açısından anlamlı bir fark bulunamamış. Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya benzer şekilde gruplar TM kalınlıkları açısından karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Topikal insülin tedavisinin, çeşitli dozlarda ve zaman aralıklarında denendiğinde, perforasyon sekeli olan atrofik membranın tedavisinde daha faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmalardaki bulguların aksine çalışmamızda gruplar arasında subepitelyal kalınlık derecelerinin oranları açısından anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0.05$). Sham grubunun fibroblast proliferasyon oranları ise topikal leptin verilen gruba göre anlamlı olarak artmış izlendi. Ancak topikal olarak fosfat tampon çözeltisi verilen grubun ve sham grubunun fibroblast proliferasyon derecelerinin oranları İP leptin verilen gruba göre anlamlı olarak artmış bulundu.

Leptinin sistemik kullanımı, sham ve topikal olarak fosfat tampon çözeltisi verilen gruba göre TM perforasyon iyileşmesinde fibroblast proliferasyonunu olumsuz etkilemektedir. Leptinin topikal kullanımı ise sham grubuna göre TM perforasyon iyileşmesinde fibroblast proliferasyonunu olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle çalışma verilerine dayanarak leptinin TM'ın atrofik iyileşmesine engel olması konusunda subepitelyal kalınlık açısından net bir kaniya varılamayacaktır. Fibroblast proliferasyonu açısından leptinin sistemik ve topikal kullanımı sham grubuna göre perforasyon sonrası atrofik membran oluşumunda faydalı bir etkisi görülmemiştir.

Lou ve ark.'nın (88) yaptığı çalışmada; yüksek dozda EGF'nin sürekli uygulanmasının, kollajen sentezini, fibroblast ve kollajen katabolizması ile inhibe ettiği ve böylece perforasyon kapanma süresini arttırdığı bildirilmiştir. Diğer yandan hafif nemli bir ortamın; granülasyon dokusu proliferasyonunu kolaylaştırdığını ve yara iyileşmesini hızlandırdığını bulmuşlar. Islak bir ortamın, yara çevresinde maserasyon oluşmasına ve iyileşme sürecinin bozulmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Travmatik TM perforasyonları için en iyi tedavinin, perforasyon kenarında hafif nemli bir ortam oluşturacak kadar miktarda günlük EGF uygulaması olduğunu öngörmüşlerdir. Daha önce TM perforasyonunda leptin ile yapılan herhangi bir çalışma olmadığından, çalışmamızda leptin dozu, literatürdeki ratlarda cilt üzerinde oluşturulan yara modelindeki topikal uygulanan leptin dozu baz alınarak belirlenmiştir. Bu dozun TM'da maserasyon oluşturacak kadar ıslak bir ortama neden olup, perforasyon kapanmasında gecikmeye neden olup olmaması konusunda net bir bilginiz mevcut değildir.

Ayrıca yara iyileşmesinde etkileri bulunan ajanların TM perforasyon onarımında da etkili olabileceği düşünülmüş. Platelet zengin plazma, heparin, hyaluronik asit, hypericum perforatum gibi ajanlar deneysel çalışmalarda, TM perforasyon onarımında non-invaziv tedavi modaliteleri olarak denenmiştir (43, 81, 82).

Erkilet ve ark.'nın (89) çalışmasında, platelet zengin plazmanın perfore rat TM'larına lokal olarak uygulanmasının iyileşme süresi ve histopatolojik sonuçlar açısından etkisini araştırmak amaçlanmıştır. 44 ratın, 88 kulağının TM'ları standart 3 mm boyutunda perfore edilmiştir. Sağ TM'larına platelet açısından zengin plazma uygulanmıştır. Sol TM'lar spontan iyileşmeye bırakılmış. 44 rat, 20 ve 24 rattan oluşan iki gruba ayrılmıştır. Grup

1'de 20 ratın TM'lerinin günlük otomikroskopik muayeneleri yapılmış. Grup 2'deki 24 rat, 6'şar rattan oluşan 4 gruba ayrılmış ve histopatolojik inceleme için 3., 7., 14. ve 28. günlerde sakrifiye edilmiş. Birinci grupta platelet zengin plazma verilen TM'ların perforasyon iyileşme süresi, spontan iyileşmeye bırakılan TM'ların iyileşme süresine göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak düşük izlenmiş. Histopatolojik inceleme için ayrılan grup 2'de ise tek başına ve gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamış. Bu bulgular ışığında platelet zengin plazmanın TM perforasyon iyileşmesini hızlandırmada etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda tüm grupların TM'ları perfore edilip kronik TM perforasyon modeli oluşturulduktan sonra 15. gün ilaç uygulamalarına geçildi ve perforasyonun kapanıp kapanmadığı 35. gün çalışma bitiminde otoendoskopi ile klinik olarak muayene edildi. Topikal olarak fosfat tampon çözeltisi verilen gruptan ve sham grubundan birer TM haricinde tüm TM perforasyonlarının kapandığı görüldü. Çalışmamızda ilaç uygulamasından çalışma bitimine kadar olan dönemde klinik muayene yapılmadı. Gruplardaki TM perforasyonlarının ne zaman iyileştiğini bilmediğimiz için; çalışmamızda perforasyon iyileşme süresi hakkında net bir bilgi ortaya konulamamıştır.

Yaşar ve ark.'nın (90) yaptığı deneysel rat çalışmasında, hypericum perforatumun topikal kullanımının TM perforasyon kapanmasındaki rolü araştırılmış. 30 dişli rat 3 gruba ayrılmış. Tüm ratların TM'ları perfore edildikten sonra, birinci grubun TM'larına topikal zeytin yağı, ikinci grubun TM'larına topikal hypericum perforatum ekstresi uygulanmış. Üçüncü grubun TM'ları ise spontan iyileşmeye bırakılmış. Histopatolojik muayenede; 7., 14., 21. günlerde her gruptan üçer ratın TM'ı incelenmek üzere, tüm grupların temporal bullaları çıkarılarak, lökosit infiltrasyonu, subepitelyal kalınlık, neovaskülarizasyon, fibroblast proliferasyonu açısından değerlendirilmiş. Spontan iyileşmeye bırakılan grupla hypericum perforatum grubu birbirleri ile karşılaştırıldığında, hypericum perforatum grubu TM'ın yara iyileşmesinde daha etkili olduğu bulunmuş. Çalışmamızda rat TM kronik perforasyon iyileşmesini değerlendirmek için; histopatolojik olarak TM'ları, lökosit infiltrasyonu, subepitelyal kalınlık, neovaskülarizasyon, fibroblast proliferasyonu gibi parametreler yönünden inceledik. Bu çalışmadan farklı olarak çalışmamızda, İP ve/veya topikal leptin verilen

grubun spontan iyileşmeye bırakılan gruba göre rat TM kronik perforasyon iyileşmesini olumsuz etkilediğini bulduk.

Bu çalışmada, yara iyileşmesi ve anjiogenezi artırıcı etkilerinden yola çıkarak leptinin topikal uygulananının TM perforasyon iyileşmesine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Literatürde, leptinin rat TM kronik perforasyonundaki etkisinin değerlendirildiği ilk çalışma olması nedeniyle, çalışmamız ayrı bir önem kazanmaktadır.

Vücut ağırlığını kontrol etmekle görevli leptin, 145-146 aminoasit uzunluğunda ve 16 k-Da ağırlığındadır. Yapı olarak sitokinlere benzer (58, 60). Ghrelin ile antagonistik çalışan bu hormon, hipotalamustaki Y nöronları aracılığıyla feedback mekanizmaları ile kontrol edilir (62). Nöroendokrin sistemin ve metabolizmanın düzenlenmesi, puberte, üreme, hematopoez, immünite, gastrointestinal fonksiyonların düzenlenmesi, sempatik sinir sistemi aktivasyonu, anjiogenez ve osteogenezis, hafıza üzerinde çok önemli rolleri olduğu saptanmıştır (67-76). Leptin defekti (ob/ob) veya leptin reseptör defekti (db/db) olan farelerde; makrofaj fonksiyonlarında, viral ve bakteriyel enfeksiyona yanıtta azalma görülür. Bu da leptinin özellikle hücrel immunitede rolü olduğunu göstermektedir. Makrofaj aktivitesini artırarak fagositozu güçlendirir. Pro ve anti-inflamatuvar sitokin salınımını uyarır. İmmun sisteme olan bu etkilerinden dolayı yara iyileşmesinde de etkili olduğu düşünülmüştür (72, 77). Leptinin yara iyileşme süresini kısalttığı ve anjiogenezi attırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur.

Tadokoro ve ark.'nın (91) yaptığı çalışmada, Ob-R geni insan ve fare derisinin epidermal hücrelerinden eksprese edilmiş. Leptinin topikal uygulamasının yara iyileşmesini önemli ölçüde arttırdığı saptanmış. Histolojik analizlerde, leptin ile tedavi edilen grubun dermal bağ dokularında daha fazla kan damarı olduğu bulunmuş. Topikal uygulanan leptinin; epidermal keratinositlerin proliferasyonunu, farklılaşmasını, fonksiyonunu ve migrasyonunu hızlandırdığı ve yara etrafında anjiogenezi artırıcı etkisiyle deride yara iyileşmesini desteklediği kanıtlanmıştır. Stallmeyer ve ark. (92), leptin eksikliği olan ob/ob genli farelerde, eksojen verilen leptinin reepitelizasyon süreçlerini geliştirdiğini göstermişler. Ayrıca JAK-STAT kaskadının aktivasyonunun yanı sıra, leptinin de primer keratinositlerde hücre dışı düzenlenen kinaz kontrollü sinyal yollarını aktive ettiğini bildirmişlerdir. Frank ve ark.'nın (93) kütanöz yara

iyileşmesinde leptinin fonksiyonunu belirlemek için yaptığı çalışmada, leptin eksikliği olan ob/ob farelerde eksizyonel olarak oluşturulan yara modelinde sistemik ve topikal olarak leptin kullanılmış. İP leptin verilen ob/ob fareler, PBS ile tedavi edilen kontrol grubu fareleri karşılaştırıldığında; İP leptin grubunda yara iyileşme sürecinde belirgin artış gözlemlenmiş. Leptin ile tedavi edilen ob/ob farelerdeki yaralar 13 gün içinde tamamen yeniden epitelize olurken, PBS ile tedavi edilen kontrol grubunda 13. günde yara üzerinde kabuk kaplı olduğu ve epitelizasyonun tamamlanmadığı görülmüştür. Çalışmamızda topikal olarak SF verilen grup, topikal leptin grubu, topikal olarak fosfat tampon çözeltisi verilen grup, İP leptin grubu ve sham grubu olmak üzere toplam 5 grup vardır. Burada kullanılan fosfat tampon çözeltisi, leptinin çözünmesinde kullanılan bir solüsyon olup Frank ve ark.'nın çalışmasına benzer şekilde çalışmamızda da leptinin topikal ve sistemik kullanımı topikal fosfat tampon çözeltisi verilen grupla karşılaştırılmıştır. Topikal leptin ve topikal olarak fosfat tampon çözeltisi verilen grupta fibroblast proliferasyonu ve subepitelyal kalınlık açısından anlamlı bir fark gözlenmedi. Ancak topikal olarak fosfat tampon çözeltisi verilen grubun fibroblast proliferasyon derecelerinin oranları İP leptin verilen gruba göre anlamlı olarak artmış bulundu. Topikal olarak fosfat tampon çözeltisi verilen grubun lökosit infiltrasyon ve neovaskülarizasyon derecelerinin oranları, topikal ve/veya İP leptin verilen grubun oranlarına göre anlamlı ölçüde artmış olarak izlendi.

Ring ve ark. (94) diabetik ob/ob farelerde, sistemik ve topikal uygulanan leptinin, derideki reseptörleri ile doğrudan etkileşerek yara onarımını hızlandırdığı bulmuşlar. Leptinin anjiogenezi önemli ölçüde uyarmadığını göstermişlerdir. Çalışmamızda İP ve topikal leptin verilen rat TM'larında subepitelyal kalınlık, lökosit infiltrasyonu, fibroblast proliferasyonu ve neovaskülarizasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Bu da leptinin TM perforasyon iyileşmesinde sistemik veya topikal uygulananının birbirine üstünlüğü bulunmadığını göstermektedir. Ancak topikal fosfat tampon çözeltisi verilen grup ve sham grubunun neovaskülarizasyon ve lökosit infiltrasyon derecelerinin oranları topikal ve/veya İP leptin grubundan anlamlı olarak artmış olduğundan; çalışmamız verileri de Ring ve ark.'nın anjienez verilerini desteklemektedir. Çalışmamızda leptinin anjiogenezi olumsuz yönde etkilediği bulunmuştur.

Murad ve ark.'nın (78) yaptığı çalışmada, cilt insizyonu ile oluşturulan yara bölgesindeki hücrelerin, yaralanmadan kısa bir süre sonra leptin sentezinde yer aldıkları ve leptin üretiminin yara bölgesindeki tüm iyileşme süreci boyunca devam ettiğini göstermişler. Böylece diğer çalışmalarda belirtildiği üzere bu çalışmada da; leptin eksikliği olan (ob/ob) veya leptin reseptör defekti (db/db) olan farelerde, şiddetli iyileşme bozukluğu olduğu ve leptin eksikliği olan (ob/ob) farelerde topikal leptin tedavisi ile bu defektin tersine çevrilebileceği gösterilmiş. Ayrıca leptin geninin hipoksi ile indüklenebilen karakterinden dolayı, yara yatağı gibi hipoksik ve iskemik dokularda upregülasyon mekanizmasının aktive olduğu ve yara iyileşmesine eşlik eden neovaskülarizasyonu arttıran leptinin proanjiogenik aktivitesinin olduğu gösterilmiştir. Çalışma sonuçları, normal yara onarımının hem lokal leptin üretimini (lokal hipoksiye cevap olarak indüklenen), hem de yara bölgesindeki fonksiyonel olarak sağlam bir leptin sinyalizasyon sistemi gerektirdiğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda; bu çalışmada gösterilen leptinin proanjiogenik aktivitesinin tersine, topikal ve/veya İP leptin verilen grubun anjiogenezi olumsuz etkilediği saptandı. Leptinin TM düzeyindeki sinyalizasyon mekanizması hakkında net bir bilgiye sahip olunamaması nedeniyle, leptinin bu çalışmada TM perforasyon iyileşmesinde anjiogenezi olumsuz etkilemesinin nedenleri tam olarak ortaya konulamamıştır.

Çalışmamızın kısıtlılıklarına baktığımızda;

- ✓ Leptin transportunda soğuk zincir kurallarına azami ölçüde uyulması ve ilacın uygulanan dokuda uzun süre bekletilmesi gibi konulara dikkat edilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda her ne kadar soğuk zincir kurallarına uyulmaya çalışılsa da, leptinin ilk uygulanım zamanında fosfat tampon çözeltisi ile çözüldükten sonra, ilerleyen doz verilme zamanlarında kullanım için çıkarılması soğuk zincirin bozulmasıyla ilacın etkinliğinin azalmasına neden olmuş olabilir.
- ✓ Literatürdeki çalışmalarda murine rekombinant leptin kullanılırken, çalışmamızda human rekombinant leptin kullanılması dolayısıyla leptinin ratlardaki etkinliği net olarak gösterilememiş olabilir.
- ✓ Çalışmanın başlangıç ve bitiş tarihleri arasında klinik muayene yapılmadığı için bu çalışmada perforasyon iyileşme süreleri açısından net bir bilgi elde edilememiştir.

6. SONUÇLAR

Toplam 42 adet yetişkin dişi rat (84 kulak), A, B, C, D ve E grupları olmak üzere randomize 5 gruba ayrıldı. A grubunda topikal olarak SF, B grubuna topikal leptin, C grubuna topikal olarak fosfat tampon çözeltisi, D grubuna İP leptin verildi. E grubu ise sham grubu olarak belirlendi ve perforasyon sonrası madde tatbik edilmedi. Deney aşamasında 1. günde anestezi sonrasında A ve B grubundan birer hayvanda kayıp yaşandı. Çalışma toplam 40 rat (80 kulak) ile tamamlandı. Gruplar çalışma sonunda 35. gün otoendoskop ile klinik olarak muayene edildi. Muayene edilen ratlar sakrifiye edilerek TM'ları histopatolojik olarak subepitelyal kalınlık, fibroblast proliferasyonu, lökosit infiltrasyonu, neovaskülarizasyon gibi parametreler açısından değerlendirildi.

1. Çalışmamız leptinin rat TM kronik perforasyondaki etkisinin değerlendirilmesi dolayısıyla literatürdeki ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.
2. Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak topikal ve sistemik leptin uygulanımı arasında TM perforasyon iyileşmesi açısından anlamlı bir fark bulunamadı.
3. Çalışma bitiminde otoendoskopi ile yapılan klinik muayenede topikal olarak fosfat tampon çözeltisi ve sham grubundan birer TM haricindeki tüm TM perforasyonlarının kapandığı gözlemlendi.
4. Bu çalışmada gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında, gruplar arasında subepitelyal kalınlık ve TM kalınlıkları açısından anlamlı bir farklılık bulunamadı. Çalışmamıza göre leptinin TM perforasyon iyileşmesinde, subepitelyal kalınlık ve TM kalınlıkları üzerinde olumlu veya olumsuz herhangi bir etkisi saptanmamıştır.
5. Çalışmada; topikal leptin ve topikal olarak fosfat tampon çözeltisi verilen grupta fibroblast proliferasyonu açısından anlamlı bir fark gözlenmedi. Sham grubunun fibroblast proliferasyon oranları topikal leptin verilen gruba göre anlamlı olarak artmış izlendi. Ancak topikal olarak fosfat tampon çözeltisi verilen grubun ve sham grubunun fibroblast proliferasyon derecelerinin oranları İP leptin verilen gruba göre anlamlı olarak artmış bulundu. Leptinin sistemik kullanımı, sham ve topikal olarak fosfat tampon çözeltisi verilen gruba göre TM perforasyon iyileşmesinde fibroblast

proliferasyonunu olumsuz etkilemektedir. Leptinin topikal kullanımı ise sham grubuna göre TM perforasyon iyileşmesinde fibroblast proliferasyonunu olumsuz etkilemektedir.

6. Çalışmamızda topikal olarak fosfat tampon çözeltisi verilen grup ve sham grubunun lökosit infiltrasyon derecelerinin oranları, topikal ve/veya İP leptin verilen grubun oranlarına göre anlamlı ölçüde artmış olarak izlendi. Bu da, leptinin TM perforasyon iyileşmesinde lökosit infiltrasyonu üzerinde olumsuz etkileri olduğunu göstermektedir.

7. Çalışmamızda topikal olarak fosfat tampon çözeltisi verilen grup ve sham grubunun neovaskülarizasyon derecelerinin oranları, topikal ve/veya İP leptin verilen grubun oranlarına göre anlamlı ölçüde artmış olarak izlendi. Bu da literatürde genel olarak belirtilenlerin tersine; leptinin TM perforasyon iyileşmesinde anjiogenez üzerinde olumsuz etkileri olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak; leptinin sistemik ve/veya topikal kullanımı rat TM kronik perforasyon iyileşmesini olumsuz etkilemektedir.

KAYNAKÇA

1. Richard R. Gacek, MD. Anatomy of the auditory and vestibular systems. Ballenger's Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery. 16th ed. Baltimore : Williams & Wilkins, 2003: 1-5.
2. Cohen D, Tamir D. The prevalence of middle ear pathologies in Jerusalem school children. Am J Otol., 1989: 10 (6): 456-9.
3. Grant JR, Arganbright J, Friedland DR. Outcomes for conservative management of traumatic conductive hearing loss. Otol Neurotol., 2008: 29(3): 344-9.
4. Glasscock III ME, Shambaugh Jr. GE. Closure of tympanic membrane perforations. In: Surgery of the Ear. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1990: 335-49, 400-23.
5. Chauvin K, Bratton C, Parkins C. Healing large tympanic membrane perforations using hyaluronic acid, basic fibroblast growth factor, and epidermal growth factor. Otolaryngol Head Neck Surg., 1999: 121(1): 43-7.
6. Spandow O, Hellström S. Healing of tympanic membrane perforation-a complex process influenced by a variety of factors. Acta Otolaryngol Suppl., 1992: 492: 90-3.
7. Imagawa K, Numata Y, Katsuura G, Sakaguchi I, Morita A, Kikuoka S, Matumoto Y, Tsuji T, Tamaki M, Sasakura K, Teraoka H, Hosoda K, Ogawa Y, Nakao K. Structure-function studies of human leptin. J Biol Chem, 1998: 273(52): 35245-9.
8. Aslan K, Serdar Z, Tokullugil A. Multifonksiyonel Hormon: Leptin. Uludağ üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2004: 30(2): 113-8.
9. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation and hematopoiesis. J Leukoc Biol., 2000: 68(4): 437-46.
10. Akyıldız N. Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi 1. Baskı, Temporal Kemik ve İşitme Organının Anatomisi. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 1998: 22-57, 251-70, 341-55.
11. Donaldson JA, Duckert L. Anatomy of the Ear. In Paparella MM, Shumrick DA, Gluckman JL, Meyerhoff WL (eds): Otolaryngology 3rd ed. Philadelphia: WB. Saunders Company 1991: 23-58.

12. Aslan A. Kulak anatomisi. Koç C. (Ed.). Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahi. Ankara: Güneş kitabevi, 2004. s.52-6.
13. Lim DJ. Human tympanic membrane. An ultrastructural observation. *Acta Otolaryngol.*, 1970: 70(3): 176-86.
14. Bickley L, Szilagyi PG. Bates' Guide to Physical Examination and History-Taking. Eleventh edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2012: p.209.
15. Rizer FM. Overlay versus underlay tympanoplasty. Part I: historical review of the literature. *Laryngoscope*, 1997: 107(12): 1-25.
16. Applebaum EL, Deutsch EC. Fluorescein angiography of the tympanic membrane. *The Laryngoscope*, 1985: 95(9):1054-8.
17. Yeo SW, Kim SW, Suh BD, Cho SH. Effects of platelet-derived growth factor-AA on the healing process of tympanic membrane perforation. *Am J Otolaryngol.*, 2000: 21(3): 153-60.
18. 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(3): 293-8.
19. Eken M, Ates G, Sanlı A, Evren C, Bozkurt S. The effect of topical insulin application on the healing of acute tympanic membrane perforations: a histopathologic study. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*, 2007: 264(9): 999-1002.
20. Lim DJ. Structure and function of the tympanic membrane (a review) . *Acta Otorhinolaryngol Belg.*, 1995: 49(2): 101-15.
21. Judkins RF, Li H. Surgical anatomy of the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, 1997: 117(5): 438-47.
22. Hebel R, Stromberg M. Anatomy of the laboratory rat, Baltimore. The Williams and Wilkins Co. 1976: s:145-52.
23. Castagno LA, Lavinsky L. Tympanic membrane healing in myringotomies performed with argon laser or microknife: an experimental study in rats. *Braz J Otorhinolaryngol.*, 2006: 72(6): 794-9.

24. Steven A, Telian MD, Cecelia E, Schmalbach MD. Chronic otitis media. In: Snow JB, Ballenger JJ editor. Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery. 16 th ed. Hamilton, Ontario: BC Decker, 2003. p. 261-93.
25. Bluestone CD, Klein JO. Infratemporal complications and sequelae of otitis media. In: Bluestone CD, Stool SE, Kenna MA (Eds.). Pediatric Otolaryngology. 3rd ed. Philadelphia: Saunders:1996: p.316–24.
26. Lee KJ. Essential Otolaryngology Head and Neck Surgery. 8th ed. Newyork: Medical Publish Co, 2004: 475–85.
27. Sarojamma SR, Satish H. A Clinical Study of Traumatic Perforation of Tympanic Membrane. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences. 2014; 13(4): 24-8.
28. Orji F, Agu C. Determinants of spontaneous healing in traumatic perforations of the tympanic membrane. Clin Otolaryngol., 2008; 33(5): 420-6.
29. Ott MC, Lundy LB. Tympanic membrane perforation in adults: how to manage, when to refer. Postgrad Med., 2001; 110(5): 81-4.
30. Lindeman P, Edstrom S, Granstrom G, Jacobsson S, Von Sydow C, Westin T et al. Acute traumatic tympanic membrane perforations. Cover or observe? Arch Otolaryngol Head Neck Surg., 1987; 113(12): 1285–7.
31. Dere H, Özcan İ, Şemi O. Kronik efüzyonlu otitis media tedavisinde modifiye Goode T tüp ile Paparella tip 1 tüpün karşılaştırılması. KBB Baş Boyun Cerrahisi Dergisi, 1997; 4(3): 201–5.
32. Nichols PT, Ramadan HH, Wax MK, Santrock RD. Relationship between tympanic membrane perforations and retained ventilation tubes. Arch Otolaryngol Head Neck Surg., 1998; 124(4): 417-9.
33. Hızalan MI, Çelik O. (Ed.). Efüzyonlu otitis media. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi, İzmir: Asya Tıp Kitabevi 2007: s.128–50.
34. Briggs RJ, Luxford WM. Chronic ear surgery: a historical review. Am J Otol., 1994; 15(4): 558-67.
35. Wullstein H. The restoration of the function of the middle ear, in chronic otitis media. Ann Otol Rhinol Laryngol., 1956; 65(4): 1021-41.

36. Zollner F. Plastic surgery of the auditory canal. II. Report of the Scandinavian Society of Ear, Nose and Throat Physicians on 24 April 1954. *Acta Otolaryngol.*, 1955: 45(2): 168-79.
37. House WF. Myringoplasty. *AMA Arch Otolaryngol.*, 1960: 71: 399-404.
38. Claros-Domenech A. 100 Tympanoplasties practised with the aid of the use of free periosteal membrane graft. *Revue de Laryngologie, Otologie, Rhinologie*, (Bordeaux), 1959: 80: 917-21.
39. Shea JJ. Vein graft closure of eardrum perforations. *J Laryngol.*, 1960: 74(6): 358-62.
40. Smyth GD. Development of surgery for conductive deafness during the past 25 years. *Br Med Bull.*, 1987: 43(4): 940-9.
41. Golz A, Goldenberg D, Netzer A, Fradis M, Westerman ST, Westerman LM, et al. Paper patching for chronic tympanic membrane perforations. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, 2003: 128(4): 565-70.
42. McGrath MH. Peptide growth factors and wound healing. *Clin Plast Surg*, 1990: 17(3): 421-32.
43. Hom DB, Maisel RH. Angiogenic growth factors: their effects and potential in soft tissue wound healing. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*, 1992: 101(4): 349-54.
44. Zhengcai-Lou, MD, Zihan-Lou, MBBS, Yongmei-Tang, MD. Comparative Study on the Effects of EGF and bFGF on the Healing. *The Laryngoscope*, 2017: 126(1): 23-8.
45. Lee MC, Seonwoo H , Garg P , Jang KJ , Pandey S , Park SB , Kim HB , Lim J , Choung YH , Chung JH. Chitosan/PEI patch releasing EGF and the EGFR gene for the regeneration of the tympanic membrane after perforation. *Biomater Sci.*, 2018: 6(2): 364-71.
46. Güneri EA, Tekin S, Yilmaz O, Ozkara E, Erdag TK, Ikiz AO, Sarioglu S. The effects of hyaluronic acid, epidermal growth factor, and mitomycin in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol.*, 2003: 24(3): 371-6.

47. Gladstone HB, Jackler RK, Varav K. Tympanic membrane wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am.*, 1995; 28(5): 913-32.
48. Johnson A, Hawke M. The function of migratory epidermis in the healing of tympanic membrane and external ear canal of the guinea pig. *J Otolaryngol*, 1985; 14(6) : 357-64.
49. Hellström S, Laurent C. Hyaluronan and healing of tympanic membrane perforations. An experimental study. *Acta Otolaryngol Suppl.*, 1987; 442: 54-61.
50. Yamaguchi Y, Yoshikawa K. Cutaneous wound healing: an update. *J Dermatol.*, 2001; 28(10): 521-34.
51. Mondain M, Ryan A. Histological study of the healing of traumatic tympanic membrane perforation after basic fibroblast growth factor application. *Laryngoscope*, 1993; 103(3): 312-8.
52. 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(5): 479-87.
53. Govaerts P, Jacob W, Marquet J. Histological study of the thin replacement membrane of human tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol.*, 1988; 105(3-4): 297-302.
54. Somers T, Goovaerts G, Schelfhout L, Peeters S, Govartes PJ, Offeciers E. Growth factors in tympanic membrane perforation. *Am J Otol* 1998; 19(4): 428-34.
55. Wang WQ, Wang ZM, Chi FL. Spontaneous of various tympanic membrane perforations in the rat. *Acta Otolaryngol* 2004; 124(10): 1141-4.
56. Mattsson C, Johansson C, Hellström S. Myringosclerosis develops within 9 hours of myringotomy. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.*, 1999; 61(1): 31-6.
57. Gimble J M. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther.*, 2003; 3(5): 705-13.
58. Kennedy GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.*, 1953; 140(901): 578-96.

59. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994; 372(6505): 425-32.
60. Lende TVD, Pas T, Veerkamp RF, Liefer SC. Leptin Gene Polymorphism and Their Phenotypic Associations. *Vitam Horm.*, 2005: 373-404.
61. Friedman JM. Leptin, leptin receptors, and the control of body weight. *Nutr Rev.*, 1998; 56(2): 38-46.
62. Correia ML, Morgan DA, Sivitz WI, Mark AL, Haynes WG. Leptin acts in the central nervous system to produce dose-dependent changes in arterial pressure. *Hypertension*, 2001; 37(3): 936-42.
63. Zeng J, Patterson BW, Klein S . Whole body leptin kinetics and renal metabolism in vivo. *Am J Physiol*, 1997; 273(6): E1102-6.
64. Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996; 81(9): 3419-23.
65. Paz-Filho G, Mastronardi C, Franco CB, Wang KB, Wong ML, Licinio J. Leptin: Molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 2012; 56(9): 597-607.
66. Himms-Hagen J. Physiological roles of the leptin endocrine system: differences between mice and humans. *Crit Rev Clin Lab Sci.*, 1999; 36(6): 575-655.
67. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 1995; 269(5223): 540-3.
68. Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet.*, 1996; 12(3): 318-20.
69. Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature*, 1997; 389(6649): 374-7.

70. Magni P, Vettor R, Pagano C, Calcagno A, Beretta E, Messi E, Zanisi M, Martini L, Motta M. Expression of a leptin receptor in immortalized gonadotropin-releasing hormone secreting neurons. *Endocrinology*, 1999: 140(49): 1581-5.
71. Bennet BD, Solar GP, Yuan JO, Thomas GR. A role for leptin and its cognate receptor in haematopoiesis. *Curr Biol.*, 1996: 6(9): 1170-80.
72. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, 1998: 394(6696): 897-901.
73. Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. The stomach is a source of leptin. *Nature*, 1998: 394(6695): 790-3.
74. Bouloumie A, Dresler HCA, Lafontan M. Leptin, the product of the Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res.*, 1998: 83(10): 1059-66.
75. Iwaniec UT, Heaney RP, Cullen DM, Yee JA. Leptin increases the number of mineralized bone nodules in vitro. *J Bone Miner Res*, 1998: 13: 2-12.
76. Karakaş A, Coşkun H, Kızılkaya F. Leptin Hormonunun Wistar Albino Sıçanlarda Hafızayı Kuvvetlendirici Etkisi. *TFBD 38. Ulusal fizyoloji kongresi özet kitabı*, 2012: 111-2.
77. Lee FYJ, Li Y, Yang EK. Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin-deficient obese mice. 1999: 276(2): 386-94.
78. Murad A, Nath AK, Cha ST, Demir E, Flores-Riveros J, Sierra-Honigmann MR. Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing. *FASEB J*, 2003: 17(13): 1895-7.
79. Wang AY, Shen Y, Wang JT, Friedland PL, Atlas MD, Dilley RJ. Animal models of chronic tympanic membrane perforation: a 'time-out' to review evidence and standardize design. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2014: 78(12): 2048-55.
80. Araujo MM, Murashima AA, Alves VM, Jamur MC, Hyppolito MA. Spontaneous healing of the tympanic membrane after traumatic perforation in rats. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2014: 80(4): 330-8.

81. Wieland AM, Sundback CA, Hart A, Kulig K, Masiakos PT, Hartnick CJ. Poly(glycerol sebacate)-engineered plugs to repair chronic tympanic membrane perforations in a chinchilla model. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, 2010; 143(1): 127-33.
82. Sundback CA, McFadden J, Hart A, Kulig KM, Wieland AM, Pereira MJ, Pomerantseva I, Hartnick CJ, Masiakos PT. Behavior of poly(glycerol sebacate) plugs in chronic tympanic membrane perforations. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, 2012; 100(7): 1943-54.
83. Somers TH, Goovaerts VH, Govaerts PJ, Offeciers FE. Histology of the perforated tympanic membrane and its muco-epithelial junction. *Clin Otolaryngol*, 1997; 22(2):162-6.
84. Wang AY, Liew LJ, Shen Y, Wang JT, von Unge M, Atlas MD, Dilley RJ. Rat model of chronic tympanic membrane perforation: A longitudinal histological evaluation of underlying mechanisms. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2017; 93: 88-96.
85. Santa Maria PL, Redmond SL, Atlas MD. Keratinocyte growth factor 1, fibroblast growth factor 2 and 10 in the healing tympanic membrane following perforation in rats. *J Mol Histol*, 2011; 42(1): 47-58.
86. Dere H, Unal A, Ozcan I, Yardimci S, Ergul G, Titiz A. Histological evaluation of basic fibroblast growth factor effect on the healing of traumatic tympanic membrane perforation (in Turkish). *Turk Otolarengoloji Arsivi*, 1997; 35: 33-7.
87. Eken M, Ates G, Sanli A, Evren C, Bozkurt S. The effect of topical insulin application on the healing of acute tympanic membrane perforations: a histopathologic study. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*, 2007; 264(9): 999-1002.
88. Lou ZC, Wei H, Lou ZH. Pretreatment factors affecting traumatic tympanic membrane regeneration therapy using epidermal growth factor. *Am J Otolaryngol.*, 2018: Epub ahead of print.
89. Erkilet E, Koyuncu M, Atmaca S, Yarim M. Platelet-rich plasma improves healing of tympanic membrane perforations: experimental study. *J Laryngol Otol*, 2009; 123(5): 482-7.

90. Yasar M, Kaya A, Karaman H, Kavugudurmaz M, Polat H, Sagit M, Ozcan I. Potential Curative Role of Hypericum Perforatum in an Experimental Rat Model of Tympanic Membrane Perforation. *J Int Adv Otol.*, 2016: 12(3): 252-6.
91. Tadokoro S, Ide S, Tokuyama R, Umeki H, Tatehara S, Kataoka S, Satomura K. Leptin promotes wound healing skin. *PLoS One*, 2015: 10(3): e0121242.
92. Stallmeyer B, Kampfer H, Podda M, Kaufmann R, Pfeilschifter J, Frank S. A novel keratinocyte mitogen: regulation of leptin and its functional receptor in skin repair. *J Invest Dermatol*, 2001: 117(1): 98-105.
93. Frank S, Stallmeyer B, Kämpfer H, Kolb N, Pfeilschifter J. Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *J Clin Invest.*, 2000: 106(4): 501-9.
94. Ring BD, Scully S, Davis CR, Baker MB, Cullen MJ, Pelleymounter MA, Danilenko DM. Systemically and topically administered leptin both accelerate wound healing in diabetic ob/ob mice. *Endocrinology*, 2000: 141(1): 446-9.