

T.C.

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI

**HAYVAN MODELİNDE TOPIKAL VE İNTRAKÜTANÖZ
BOTULİNUM TOKSİNİ UYGULAMASININ, DIŞ KULAK
YOLU EPİTEL VE SALGI BEZLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DENEYSEL ÇALIŞMA

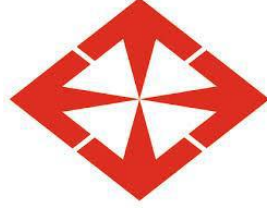
Dr. Muhammed Furkan SÖKMEN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Alper Nabi ERKAN

ADANA / 2017



T.C.

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI

**HAYVAN MODELİNDE TOPIKAL VE İNTRAKÜTANÖZ
BOTULİNUM TOKSİNİ UYGULAMASININ, DIŞ KULAK
YOLU EPİTEL VE SALGI BEZLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DENEYSEL ÇALIŞMA

Dr. Muhammed Furkan SÖKMEN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Alper Nabi ERKAN

ADANA / 2017

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Anabilim Dalı Başkanımız ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Levent Naci Özlüoğlu'na;

Eğitimimde çok büyük katkısı olan ve bana her alanda desteklerini esirgemeyen bölüm sorumlumuz değerli hocam Sayın Prof. Dr. İsmail Yılmaz'a;

Tezimin hazırlanmasında ve eğitimimde bana büyük destek olan hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Alper Nabi Erkan'a;

Kliniğimizde birlikte çalışmaktan büyük zevk aldığım ve eğitimimde büyük katkıları olan Sayın hocalarım Doç. Dr. Cüneyt Yılmaz, Dr. Cem Özer, Yrd. Doç. Dr. Fulya Özer, Doç. Dr. Can Alper Çağıcı, Doç. Dr. Haluk Yavuz ve Doç. Dr. Fatma Çaylaklı'ya;

Tezimin hazırlanmasında ve diğer çalışmalarımda yanımda bulunup özveri ile yardım eden Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyemiz, Sayın Yrd. Doç. Dr. Emine Tuba Canpolat'a;

Tez çalışmamın her aşamasında tüm özverisi ile bana destek olan Odyometrist Sayın Gamze Özer'e;

Klinikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm hemşire ve personel arkadaşlarıma;

Sevgisi ve fedakarlığı ile her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen saygıdeğer ve çok kıymetli abim Dr. Oğuz Güvenmez'e;

Hayatın tüm zorluklarına rağmen bana her türlü eğitim ve öğrenim olanağını sunan, bana her zaman destek olan ve beni hayata hazırlayan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Muhammed Furkan Sökmen

ÖZET

Amaç: Botulinum toksininin erişkin rat dış kulak yolu epiteli ve salgı bezleri üzerine olası histopatolojik etkilerini araştırmak. Bu çalışma ile botulinum toksininin, dış kulak yoluna etkisini görmek ve güvenilir olup olmadığı hakkında literatüre katkıda bulunmak hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Bu deneysel çalışma Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında 48 adet rat üzerinde yapıldı. Ratlar uygulama şekillerine göre 2 ana gruba, her iki ana grup ise takip sürelerine göre üçer alt gruba ayrıldı. Tüm hayvanların sağ kulaklarının dış kulak yoluna botoks uygulandı. Sol kulaklara ise herhangi bir uygulama yapılmadı ve kontrol grubu olarak belirlendi. Grup I'e topikal, grup II'ye intrakütanöz enjeksiyon şeklinde botoks uygulandı. Grup Ia ve IIa 10. günde, grup Ib ve IIb 30. günde sakrifiye edildi. Grup Ic ve IIc ye ise 30. günde ikinci doz botoks uygulaması yapıldı ve ikinci uygulamanın 10. gününde de bu gruplar sakrifiye edildi. Uygulama ve takip süresi bitiminde ratlar dekapite edilerek dış kulak yolu diseke edildi ve patolojiye teslim edildi.

Bulgular: Tüm gruplarda inflamasyona rastlandı, fakat gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). Sekresyon miktarında tüm gruplarda değişiklik görülmedi. Kalsifikasyon ise sadece grup II'de görüldü. Kontrol grubu ve grup I'e göre istatistiksel anlamlı yüksek idi ($p=0,0001$). Tüm gruplarda apoptozis gözlemlendi. ApopTag skorları grup I ve II'de kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı yüksek bulundu. Grup I alt grupları ApopTag skorları kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık görülmedi ($p>0,05$). Grup II alt grupları ApopTag skorları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise; IIb'de IIa'ya göre sebase bez skoru ($p=0,003$), IIc'de IIa'ya göre epitel ($p=0,021$) ve sebase bez ($p=0,01$) skorları istatistiksel anlamlı yüksek bulundu.

Sonuçlar: Bu çalışma botulinum toksininin ratların dış kulak yolu epiteli ve salgı bezlerinde inflamasyon, kalsifikasyon ve apoptozise yol açtığını, sekresyon miktarında ise değişikliğe neden olmadığını göstermiştir. Fakat uygulanan botulinum toksini dozunun artırılması, tekrarlayan dozlarda uygulanması ve uygulama sonrası geçen sürenin uzatılması daha olumlu sonuçlar verebilir. Bu nedenle bu çalışmanın ileri deneysel ve klinik çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Botoks, Dış Kulak, İntrakütanöz, Rat, Serümen, Topikal

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study is to investigate the use of botulinum toxin about the possible histopathological effects on the rat external ear path epithelium and secretory glands. It is targeted with this study, the effect of botulinum toxin on the external ear path and contribute literature about whether applied is reliable.

Materials and Methods: This experimental study was conducted on 48 rats, in Baskent University Faculty of Medicine Experimental Animal Research Laboratory. The rats were divided into 2 main groups according to the application forms. The two main groups were divided into three subgroups according to follow-up periods. Botox was applied to the right external auditory canal of all animals. No treatment was applied to the left ears and the control group was identified. Botox applied group I topically, group II Intracutaneous injection. Group Ia and IIa were sacrificed on day 10, and groups Ib and IIb were sacrificed on day 30. Group Ic and IIc received a second dose of botox on the 30th day and these groups were sacrificed on the 10th day of the second application. At the end of the application and follow-up period, the rats were decapitated and the external ear canal was disrupted and the pathology was delivered.

Results: Inflammation was found in all groups, but no statistically significant difference was observed between the groups ($p > 0,05$). There was no change in the amount of secretion in all groups. Calcification was seen only in group II. It was statistically higher than control group and group I ($p=0,0001$). Apoptosis was observed in all groups. ApopTag scores were statistically higher in groups I and II compared to control group. There was no statistically significant difference between group I subgroup ApopTag scores ($p > 0.05$). When the ApopTag scores of group II subgroups are compared among themselves; the sebaceous gland score ($p=0,003$) according to IIa in IIb, epithelium ($p=0,021$) and sebaceous gland ($p=0,01$) scores were statistically significant higher according to IIa in IIc.

Conclusions: This study has shown that botulinum toxin causes inflammation, calcification and apoptosis in the external ear path epithelium and glandular secretions of rats and does not alter the amount of secretion. However, increasing the administered dose of botulinum toxin, application in repeated doses and prolonging post-administration period benefit may give more positive results. For this reason it is thought that this work should be supported by further experimental and clinical studies.

Keywords: Botox, External Ear, Intracutaneous, Rat, Serumen, Topical

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİL DİZİNİ.....	VI
FOTOGRAFLAR DİZİNİ.....	VII
TABLO DİZİNİ.....	VIII
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	IX
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kulak Embriyolojisi.....	2
2.2. Temporal Kemik Anatomisi.....	4
2.2.1. Squamöz Parça.....	4
2.2.2. Mastoid Parça.....	5
2.2.3. Petröz Parça.....	6
2.2.4. Timpanik Parça.....	8
2.3. Kulak Anatomisi.....	8
2.3.1. Dış Kulak.....	9
2.3.1.1. Kulak Kepçesi (Aurikula, Pinna).....	9
2.3.1.2. Dış Kulak Yolu (Meatus Acusticus Externus).....	10
2.3.1.3. Timpanik Membran (Kulak Zarı).....	12
2.3.2. Orta Kulak.....	14
2.3.2.1. Östaki Borusu (Tuba Östaki).....	17
2.3.3. İç Kulak.....	18
2.4. Rat Kulak Anatomisi.....	19
2.5. Botulinum Toksini.....	21
2.5.1. Tarihçesi.....	21
2.5.2. Fiziksel ve Kimyasal Yapısı.....	23
2.5.3. Etki Mekanizması.....	25
2.5.4. Kullanım Alanları.....	27
2.5.5. Yan Etkileri.....	30
2.5.6. Preparatları ve Farmakolojik Özellikleri.....	31

2.3.7. İlaç Etkileşimleri	32
3. MATERYAL ve METOD.....	33
3.1. Deney Hayvanları	33
3.2. Gruplar.....	33
3.3. Deney Hayvanlarının Hazırlanması ve Deneysel İşlem	34
3.4. Sakrifikasyon ve Diseksiyon	37
3.5. Histopatolojik İnceleme.....	38
3.5.1. Patolojik değişkenlikler.....	38
3.5.1.1. İnflamasyon	38
3.5.1.2. Sekresyondaki değişiklikler	38
3.5.1.3. Kalsifikasyon.....	39
3.5.1.4. Apoptozis değerlendirmesi.....	39
3.6. İstatistiksel Analiz	43
4. BULGULAR	44
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇLAR	54
KAYNAKLAR.....	55

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Temporal kemik ¹³	4
Şekil 2. Kulak anatomisi (anterior kesit) ³²	8
Şekil 3. Kulak kepçesi (Aurikula, Pinna) ³⁶	9
Şekil 4. Dış kulak yolu (Meatus Acusticus Externus) ³⁶	10
Şekil 5. Timpanik membran (Kulak Zarı) ³⁶	12
Şekil 6. Orta kulak ⁴⁹	15
Şekil 7. Kemikçikler ⁵³	16
Şekil 8. İç kulak yapıları ³⁶	19
Şekil 9. Botulinum toksini kimyasal yapısı	24
Şekil 10. Botulinum Toksini Etki Mekanizması ⁸⁴	25
Şekil 11. SNARE protein kompleksi ve botulinum toksin serotipleri ⁸⁵	26
Şekil 12. Botoks aktivitesinin sonlanma aşamaları (Solda aksonal filizlenme, sağda sinir terminallerinin yeni fonksiyonel nöromusküler bileşkeyi oluşturması) ⁸⁴	27

FOTOGRAF DİZİNİ

Fotoğraf 1.	Rat dış kulak yolu muayenesi (kırmızı ok dış kulak yolu, siyah ok TM)	34
Fotoğraf 2.	Şerit şeklinde hazırlanmış spongostanlar	35
Fotoğraf 3.	Botulinum toksin Tip A preparatı. Botox®	35
Fotoğraf 4.	Dış kulak yoluna botoks emdirilmiş spongostan yerleştiriliyor.....	36
Fotoğraf 5.	Dış kulak yoluna botoks enjeksiyonu yapılıyor (kırmızı yıldız enjektör).	36
Fotoğraf 6.	Diseke edilmiş rat dış kulak yolu	37
Fotoğraf 7.	Epitel, deri ekleri, tükürük bezi dokusu içeren histolojik kesit. H.E.X100	40
Fotoğraf 8.	İnflamasyon içermeyen örnekler. H.E. X100	40
Fotoğraf 9.	İnflamasyon içeren örnekler. H.E.X100	41
Fotoğraf 10.	Tükürük bezi dokusu çevresinde kalsifikasyon odağı. (Oklar: Kalsifiye alanlar) H.E.X100	41
Fotoğraf 11.	Tükürük bezi asinilerinde ApopTag boyanması değerlendirilen hücreler. (Oklar: Apoptozise giren hücreler) X400	42
Fotoğraf 12.	Epitel hücrelerinde ApopTag boyanması değerlendirilen hücreler. (Oklar: Apoptozise giren hücreler) X400.....	42
Fotoğraf 13.	Sebase bez yapılarında ApopTag boyanması değerlendirilen hücreler. (Oklar: Apoptozise giren hücreler) X400.....	43

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Botulinum Toksininin Klinikte Kullanım Alanları	29
Tablo 2. Patolojik Değişkenlikler	44
Tablo 3. ApopTag skorları.....	44
Tablo 4. Grup I ve Kontrol Grubu ApopTag Skorları Karşılaştırması.....	45
Tablo 5. Grup II ve Kontrol Grubu ApopTag Skorları Karşılaştırması	45
Tablo 6. Grup I ve II ApopTag Skorları Karşılaştırması.....	45
Tablo 7. Grup I ApopTag Skorları	46
Tablo 8. Grup II ApopTag skorları.....	46
Tablo 9. Grup IIa ve IIb ApopTag Skorları Karşılaştırması.....	47
Tablo 10. Grup IIa ve IIc ApopTag Skorları Karşılaştırması.....	47
Tablo 11. Grup IIb ve IIc ApopTag Skorları Karşılaştırması.....	47

KISALTMALAR VE SİMGELER

A.	: Arteria
AAO-HNS:	American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery
AEC	: 3-Amino-9-ethylcarbazole
APO2.7	: Mitokondrial membranda yerleşen ve apoptozisin erken fazlarında ortaya çıkan bir protein
ark.	: Arkadaşları
Botoks	: Botulinum Toksin
Btx A	: Botulinum toksin tip A
Btx B	: Botulinum toksin tip B
Btx	: Botulinum toksini
C	: Karbon
cc	: Cubic centimeter (hacim birimi)
cm	: Santimetre
DKY	: Dış kulak yolu
DNA	: Deoksiribonükleik asit (Deoxyribonucleic acid)
D-PAS	: Diastazlı Periodik Asit Schiff
dUTP	: 2'-deoksiüridin 5'-trifosfat (2'-deoxyuridine 5'-triphosphate)
dzm	: Diziyem
EMG	: Elektromiyografi
FDA	: Food and Drug Administration
gr	: Gram
H.E.	: Hemotoksilen Eozin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
IU	: International unit
KBB	: Kulak Burun boğaz
kD	: Kilodalton
kg	: Kilogram
LD50	: Test edilen grubun %50'sini öldürecek doz
m.	: Musculus
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre

mm²	: Milimetrekaare
N	: Azot
N.	: Nervus
NY, ABD	: New York, Amerika Birleşik Devletleri
ÖT	: Östaki tüpü
p	: İstatistiksel olasılık (probability)
PAS	: Periodik Asit Schiff
PBS	: Phosphate Buffer Saline
pH	: Power of Hydrogen
SNAP25	: 25kD sinaptozom ilişkili protein
SNARE	: Soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor attachment proteine receptor
SSK	: Semisirküler kanal
TM	: Timpanik membran
TME	: Temporomandibuler eklem
TUNEL	: Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP Nick End Labeling
U	: Ünite
V.	: Vena
VAMP	: Vesicle -associated membrane protein
~	: Yaklaşık
°C	: Santigrat derece
°F	: Fahrenheit derece
µg	: mikrogram

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Anaerobik gram(-) bir bakteri olan Clostridium botulinumun ürettiği botulinum toksin proteini, bilinen en potent toksindir. Ondokuzuncu yüzyılın sonlarında sistemik bir besin zehirlenmesi olan botulizm nedeni olarak bulunmuştur. Botulinum toksini duyu iletimini etkilemezken, periferik motor, sempatik ve parasempatik sinir sistemlerinde sinyal iletimini engelleyerek etki gösterir.

Botulinum toksini ilk kez Dr. Alan Scott tarafından 1973 yılında kullanılmıştır. Dr. Alan Scott, hayvan deneylerinde strabismus ve blefarospazm tedavisinde kullanmıştır.¹ 1979 yılında ise ilk kez insanlarda strabismus tedavisinde kullanmıştır.² Son yıllarda botulinum toksini geniş bir alanda kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle fokal distoniler (blefarospazm, spazmodik disfoni vb), istemsiz hareketler (palatal myoklonus, hemifasiyal spazm, tremor), uygun olmayan kontraksiyonlar (strabismus, kekemelik, spastik mesane, akalazya) ve kozmetik (kırısklıklar, fasiyal asimetri) amaçlı kullanılmaktadır. Ayrıca vücut sıvılarının hipersekresyonunda, ter veya mukus salgılamasını azaltmada ve malign hastalıkların ülserlerinde de kullanılmaktadır.¹ Botulinum toksini, hipersalivasyon tedavisi amacıyla submandibuler ve parotis bezlerine enjekte edilmekte, postoperatif tükürük fistüllerinde de kullanılmaktadır.³⁻⁷ Yine intrinsik veya allerjik rinit tedavisinde de kullanılmaktadır.⁸⁻¹⁰

Literatürde botulinum toksininin dış kulak yoluna uygulanımı ve etkisi ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır.

Bu çalışmada botulinum toksininin erişkin rat dış kulak yolu epiteli ve salgı bezleri üzerine histopatolojik etkileri araştırılarak; elde edilen sonuçlara göre insan dış kulak yoluna etkisi öngörülebcektir.

Bu çalışmadaki beklentimiz; bir çok insanda rahatsızlığa sebep olan dış kulak yolunda aşırı serumen birikiminin, botulinum toksininin salgı azaltıcı etkisi ile azaltılabileceği düşünölüp, bunun dış kulak yolundaki etkilerini öncelikle erişkin ratlarda görmektir. Aynı zamanda dış kulak yoluna topikal ve intrakütanöz enjeksiyon yoluyla uygulanan botulinum toksininin güvenilir olup olmadığı ve hangi uygulamanın daha etkili olduğu hakkında bilgi edinilip literatüre katkıda bulunulacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kulak Embriyolojisi

Dış kulak, kulak kepçesi ve dış kulak yolundan oluşur. Bu yapılar birinci farengeal cep ile birinci ve ikinci brankial arkuslardan oluşur. Embriyolojik dönemin üçüncü haftasında "his tomurcukları" diye isimlendirilen, birinci ve ikinci arkuslardan gelişen 6 tomurcuk oluşur. İlk üçü birinci, son üçü ikinci brankial arkustan oluşur. Onikinci haftada his tomurcuklarının birleşmesi ile kulak kepçesi oluşur. Yirminci haftada erişkin şeklini alır ve dokuz yaşında erişkindeki çaplarına erişir.¹¹

Birinci arkus: 1. tomurcuk - Tragus

2. tomurcuk - Krus heliks

3. tomurcuk – Heliks

İkinci arkus: 4. tomurcuk - Antiheliks

5. tomurcuk – Antitragus

6. tomurcuk - Kulak kepçesi lobülü oluşur.

DKY gelişimi, embriyolojik dönemin 8. haftasında birinci faringeal cebin derinleşmesi ile başlar. Epitel doku ile 12. haftada doldurulur ve kanal 28. haftada rekanalize olur. Rekanalize olması ile ilgili aksaklık olduğu durumlarda, kanal darlığı veya kanal atrezisi meydana gelir. DKY'nin kemikleşmesi üç yaşında tamamlanır ve dokuz yaşında erişkin şeklini alır. Brankial ektoderm ile faringeal endodermin karşı karşıya geldiği bölge, timpanik membranı oluşturur.¹²

Kulak zarı üç germ tabakasının birleşmesi ile oluşur. En dışta ektodermden gelişen epitel, ortada mezodermal tabakadan gelişen fibröz doku, en içte ise endodermal tabakadan gelişen mukoza vardır ve 28 haftalık embriyoda kulak zarı görünür hale gelir.

Birinci faringeal cebin dışa doğru büyümesi ile timpan boşluğu oluşur. Birinci faringeal cep üçüncü haftadan başlayarak dışa doğru bir oluk şeklinde gelişir. Birinci ve ikinci brankial arkuslar arasındaki bu oluk dar ve uzun bir boru halini alır. Burası tuba östakiyi oluşturur. Östaki borusu şekillendikten sonra dört primer kese oluşur: Sakkus antikus, medius, süperior ve postikus. Bu keselerden orta kulak, mastoid ve petröz kemik havalı hücreleri gelişir.

-Sakkus antikus: Von troeltsch cebi

-Sakkus medius: Atik ve petröz hücrelerin havalanmasını sağlar.

-Sakkus süperior: Arka Von troeltsch cebi ve alt inkuidal boşluk antrum ve mastoid

hücrelerin squamöz parçasını havalandırır. Sakkus süperior ile medius arasındaki mukozal katlantılar ortadan kalkmaz ise petrosquamöz lamina (körner septumu) oluşur.

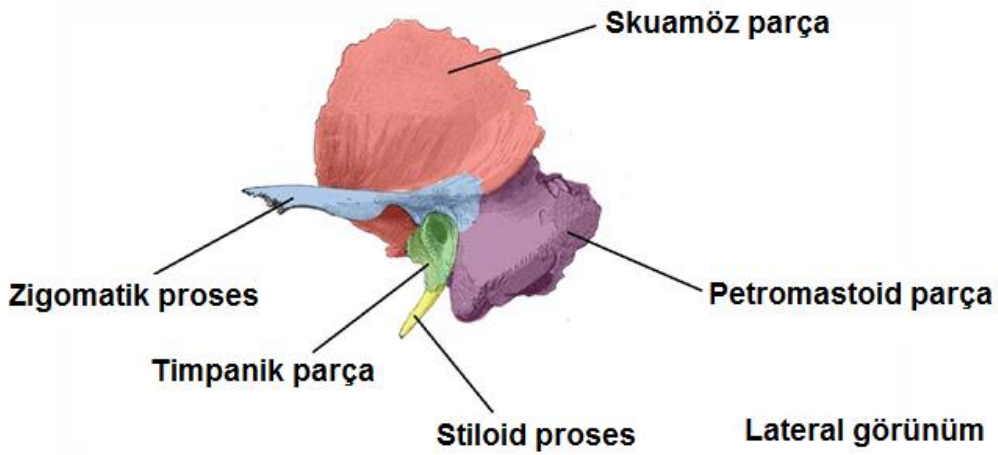
-Sakkus Postikus: Yuvarlak pencere, sinüs timpani, orta kulak medial duvarı ve oval pencerenin büyük kısmını oluşturur.

Dört-altıncı haftalar arasında orta kulak boşluğunun alt kısmı oluşur. Orta kulak boşluğundaki kasların tendonları, mukoza plikaları ve korda timpani 3-7. aylar arasında oluşur. Orta kulak gelişimi yaklaşık olarak 30. haftada tamamlanır. Birinci ve ikinci brankial arkusların mezoderminin kondanase olmasıyla orta kulaktaki kemikçikler gelişir. Birinci brankial arkus (mandibular ark, meckel kıkırdağı) mezoderminden; malleusun baş ve boynu, inkusun gövde ve kısa kolu, anterior malleolar ligaman, sfenomandibuler ligaman ve mandibula gelişir. Malleus kısa kolu ise meckel kıkırdağından bağımsız olarak intramembranöz kemikleşme sonucunda oluşur. İkinci brankial arkusun (reichert kıkırdağı) mezoderminden; manibrium mallei, inkusun uzun kolu, stapes, stiloid proses, stilohyoid ligaman ve hyoid kemik gelişir. Stapes tabanı otik kapsülden gelişir. M. tensor timpani birinci faringeal arkustan, m. stapedius ise ikinci faringeal arkustan gelişir. Bundan dolayı m. tensor timpani n. mandibularisle, m. stapedius ise n. fasiyalis ile innerve olur. Orta kulak mukozasını oluşturmak için stapes tabanının endoteli, kemikçikler etrafını ve orta kulak boşluğunu örter. Mastoid antrum 22. haftada gelişir ve 34. haftada yaklaşık olarak tamamlanmış olur. Doğumda sadece orta kulak boşluğu ve mastoid antrum mevcuttur. Doğumdan sonra mastoid kemik ve mastoid hücreler oluşur. Mastoid kemiğin havalanması (pnömatizasyonu) doğumla başlar ve ortalama 5-6 yaşlarında tamamlanır.¹²

İç kulak; embriyonal dönemin üçüncü haftasında, ektodermden gelişen, lamina otika adı verilen bir alan olarak gelişmeye başlar. Daha sonra bu alan çukurlaşarak fossa otika denilen kısmı oluşturur. Bu işitme çukuru derinleşerek bir kese halini alır ve yüzey epiteli ile bağlantısı kesilir. Oluşan bu alana otik vezikül denir. Otik vezikül daha sonra koklea, semisirküler kanallar (SSK) ve vestibülü meydana getirecek şekilde değişikliğe uğrar. İç kulak taslağı başlangıçtan itibaren bağ dokusu ile çevrilidir. Bu bağ dokusu daha sonra içte jelatinöz, dışta kıkırdak olmak üzere iki tabakaya ayrılır. Bu iki tabakanın birbirinden ayrılmasıyla perilenfatik aralık oluşur. Jelatinöz tabaka; zar labirenti, kıkırdak tabaka; kemik labirenti oluşturur. İç kulağın gelişimi, embriyonel gelişimin üçüncü haftasında başlayıp 28. haftasında sonlanır.¹²

2.2. Temporal Kemik Anatomisi

Temporal kemik; parietal, oksipital, zigomatik ve sfenoid kemik arasına yerleşmiş olup, kafatasının yan ve alt duvarının oluşumuna katılır. Bundan dolayı kafa tabanının da bir parçasıdır. İşitme ve dengenin periferik organlarını içinde bulunduran kulak, temporal kemik içerisine yerleşmiştir. Temporal kemik, squamöz, mastoid, timpanik ve petröz olmak üzere dört ana kısımdan oluşmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Temporal kemik¹³

2.2.1. Squamöz Parça

Parietal kemik, frontal kemik ve sfenoid kemiğin büyük kanadı ile eklem yapar. Parietal kemiğin bir parçası ve sfenoid kemiğin büyük kanadı ile birlikte orta kafa tabanının lateral sınırını oluşturur. Dış yüzeyi, temporal kas için tutunma yeri olan linea temporalis inferior ile mastoid kısımdan ayrılır. Linea temporalis inferior anteriora doğru zigomatik çıkıntı ile devam etmektedir. Temporomandibuler fossanın üst sınırını bu çıkıntı yapar. Bu çıkıntıya masseter kası yapışır. Bu çıkıntının ortasında enine olarak bulunan petrotimpanik yarık (Glasser yarığı) bulunur ve çıkıntının altındaki fossa mandibularis'i ikiye ayırır. Glasser yarığı içinden internal maksiller arterin timpanik dalı geçer. A. temporalis media, squamöz parça dış yüzünün arka üst kısmında bulunan bir oluktan geçer. Mastoid parçayla birleşim yerine timpanomastoid fissür denir. Bu fissür, malign eksternal otitte dış kulak yolundan kafa tabanına enfeksiyonun yayılması için bir yol olabilir. Squamöz parça iç yüzündeki en belirgin yapı a. meningeal media'nın oturduğu derin bir oluktur.^{14,15}

2.2.2. Mastoid Parça

Mastoid kemik posterolateralde yerleşmiştir. Tabanı yukarıda, tepesi aşağıda bir üçgen şeklindedir. Squamöz ve petröz parçaların oksipital ve parietal kemiklerle birleşmesinden oluşur. Temporal kemiğin en büyük kısmıdır. Lateral yüzündeki en belirgin kısım dış kulak yolunun üst arka kısmında yerleşim gösteren küçük kemik çıkıntı olan suprameatal çıkıntı, yani "Henle spini"dir. Henle spininin hemen arka kısmında bulunan çukur ve delikli bir görünüme sahip alana da "Area Kribrosa" denir. Area kribrosa ve henle spini, aurikula ve dış kulak yolunun kıkırdak yapılarının tutunmasını sağlayan bantların yapıştığı yerlerdir.

İki yüzü vardır. Dış yüzünün squamöz parça ile birleşmesinden oluşan petrosquamöz suture, zigomatik kökten arkaya doğru uzanarak orta kafa çukurunun alt sınırını yapar. Buna "Linea Temporalis" denir. Mastoid parçanın dış yüzü alt kısmına sternokleidomastoid adelesi yapışır. Kemiğin iç yüzünün posteriorunda sigmoid sinüs'ün yerleştiği "Sulkus Sinüs Sigmoidea" adı verilen derin bir sulkus bulunur. Sigmoid sinüs lateral sinüsün bir devamı olup aşağıda juguler bulbusla internal juguler vene dökülür.

Mastoid kemiğin iç ve dış yüzeyleri arasında içi hava dolu hücreler bulunmaktadır. Bunlara mastoid hava hücreleri denir. Bunlardan en büyüğüne antrum adı verilir. Antrumun büyüklüğü değişken olabilir. Bazen petrosquamöz septum bulunur. Buna körner septumu denir. Körner septumu temporal kemiğin petrozal ve squamöz parçalarının embriyolojik birleşim yerini gösterir. Bu körner septumu mastoid kemiği süperfisial ve medial iki kısma ayırır. Mastoid kemiğin iki yaşından sonraki gelişimi ile lateral kısmı öne ve aşağıya doğru büyüyüp mastoid çıkıntısını oluşturur.¹⁶

Mastoid kemik pnömatize olmuş hücrelerden oluşur. Bu hücreler değişik bölgelerde bulunmaktadır. Bazı anatomik yapıların (sigmoid sinüs, juguler bulbus) pozisyonu ile mastoid hava hücrelerinin pnömatizasyonu arasında ilişki olduğu bilinmektedir.¹⁷⁻²⁰

Doğumda pnömatizasyon daha azdır ve hava yerinde kemik iliği mevcuttur. Pnömatizasyon, çocuğun ilk solunumunda havanın orta kulağa geçmesiyle başlar ve 5-6 yaşlarına kadar devam eder. İlerleyen yaşlarda kemik iliğinin yerini havalı hücreler alır. Doğumda havalı hücreler antrum ve hemen bitişiğindeki mastoid ile sınırlı iken, kemik iliğinin yerini alarak ilerler. Ancak postnatal dönemdeki enfeksiyonlar, sklerotik yeni kemik oluşumuna yol açarak pnömatize boşluğun çevrelenmesine neden olur ve pnömatizasyonu engelleyebilir.

Mastoid kemikte üç çeşit pnömatizasyon tipi bulunmaktadır. Bunlar;

- Sellüler tip: Hava hücreleri çok sayıdadır ve geniştir.

- Diploik tip: Hava hücreleri az sayıda ve daha küçüktür.
- Sklerotik tip: Hava hücresi bulunmaz.

Mastoid kemiklerin % 20'si diploik ve sklerotiktir. Çocuğun ilk solunumunda mastoid pnömatizasyon, havanın orta kulağa geçmesi ile başlar ve 6 yaşına kadar tamamlanır.

Mastoid kemiğin inferior kısmı mastoid apeks olarak adlandırılır. Bu bölgenin en alt kısmında dıştan oluk tarzında digastrik kasın tutunma yeri bulunmaktadır. Bu oluğun hemen ön kısmında stilomastoid foramen izlenmektedir. Fasiyal sinir kanalı (Fallop kanalı)'nın vertikal parçası mastoid kemik içinde bulunmaktadır. Korda timpani, genellikle fasiyal sinirin vertikal parçasından köken alan sensitif bir daldır. Stilomastoid foramenin ortalama 5 mm. süperiorunda olacak şekilde fasiyal sinirden ayrılır, anterosüperomediale doğru kordal kanal içinde seyrettikten sonra kordal kretten orta kulağa girer. Fasiyal sinirin dış kulak yolu cildinin duysal innervasyonunu sağlayan dalı da vertikal segmentten çıkmaktadır. Fasiyal sinirden ayrıldıktan sonra anteroinferolateral seyir göstererek timpanomastoid sütürden dış kulak yoluna dağılır.

Mastoid antrumun medial duvarında semisirküler kanallar yerleşmiştir. Mastoid kemik içinde süperior petrozal sinüs, sigmoid sinüs ve posterior semisirküler kanal arasında kalan üçgen alan "Trautmann Üçgeni" adını alır. Burası posterior fossaya ulaşım alanı olarak bilinmektedir.²¹

2.2.3. Petröz Parça

Üç yüzeyli bir piramide benzer ve temporal kemiğin en medial bölümünü oluşturur. Petröz kemik içinde otik kapsül (koklea, vestibül, semisirküler kanallar), labirent, internal karotid kanal, fasiyal sinir, vestibülokoklear sinir bulunur.

Süperior kısmı temporal lobun oturduğu alan olup orta kafa çukuru alt yüzünü oluşturur. Bu kısmın üzerindeki en belirgin yapı süperior semisirküler kanal tarafından oluşturulduğu savunulan bir çıkıntı olan "Arkuat Eminens"tir.

Arkuat eminensin önünde, genikulat ganglionun yer aldığı bir fossa bulunur. Bu fossadan öne doğru uzanan sulkus içinde n. petrozus süperfisiyalis major ve a. meningea media bulunur. Süperior petrozal sinüse ait oluk ön yüz ile arka yüzün birleşim yerinde bulunmaktadır.²²

Kemiğin arka yüzünde önemli klavuz noktalar bulunur. Bunlardan en belirgin olanı internal akustik kanalın ağzı "Porus Akustikus"tur. Porus akustikus internal akustik kanalın serebellopontin köşeye açılma yerine denir. İnternal akustik kanal içinde fasiyal sinir,

vestibülokoklear sinir, fasiyal sinirin duyusal dalı olan n. intermedius ve a. auditiva interna bulunmaktadır.^{23,24} Bazen internal akustik kanal içinde 7. ve 8. sinir arasında, anterior inferior serebellar arter de bir kıvrım yaparak yerleşim gösterebilir.²⁵

İç kulakla ilişkide olduğu kısma ise "Fundus" denir. Fundus seviyesinde posterior semisirküler kanal ampullası ile internal akustik kanalın inferior parçası arasında singular kanal bulunur.²⁶ İçinden posterior ampuller sinir geçer. Fasiyal sinirin fundustaki giriş deliğinden genikulat gangliyona kadar olan parçası labirenter parça adını alır. Internal akustik kanalın hemen lateralinde posterosüperiorunda subarkuat fossa denen bir çukur alan bulunur. Bu alanda subarkuat kanalikulus içinden subarkuat arter geçer ve posterolaterale seyrederek kemik labirent, fasiyal kanal ve mastoid mukozanın kanlanması sağlar.

Internal akustik kanal ile mastoid kemik iç yüzündeki sigmoid sinüs çukuru arasında vestibüler aquaduktusun eksternal açılış deliği bulunur. Bu deliğe "Endolenfatik fossula veya Ungual fossula" denir.

Petröz kemik tabanında juguler bulbusa ait bir oluk ve bunun hemen anteriorunda internal karotid artere ait bir oluk izlenmektedir. Petröz parçanın bu kısmı ile oksipital kemik arasındaki açıklık kafa tabanındaki önemli nörovasküler yapılar için bir geçiş alanı olup juguler foramen (posterior foramen laserum) olarak bilinmektedir. Aslında bu gerçekte bir kanal özelliğinde olup kemik ve fibröz bantlarla anterior ve posterior iki bölmeye ayrılır. Anterior bölüm 9,10 ve 11. kranial sinirleri içerirken posterior bölüm juguler bulbusu içerir. Juguler bulbustan ayrılan inferior petrozal sinüs bu kranial sinirler arasından geçmektedir.^{27,28}

Krista falsiformis, meatus akustikus internusun lateral ucunu süperior ve inferior olarak böler. Süperior kompartman ise "Bill's Barı" adı verilen bir yapı ile vertikal olarak anterior ve posteriora ayrılır. Süperiorda önde fasiyal sinir, arkada da vestibüler sinirin üst dalı bulunur. İnferior bölüm ise; önde koklear siniri, arkada da vestibüler sinirin alt dalını içerir.²²

Petröz kemiğin lateral yüzü ise orta kulağın medial duvarını oluşturur. Petröz apekte tentorium ve petröz kemik arasında, 5. kafa çiftinin geçişi için kanal oluşturan hiatus bulunur. Buna "Meckel Kovuğu" denir. Altıncı kafa çifti siniri, posterior klinoid çıkıntının hemen altında ve petröz ile sfenoid kemiğin eklemleşme yerinin üzerinde olan "Dorello Kanalı" denilen bir çentiğin içinden geçer.²⁹

2.2.4. Timpanik Parça

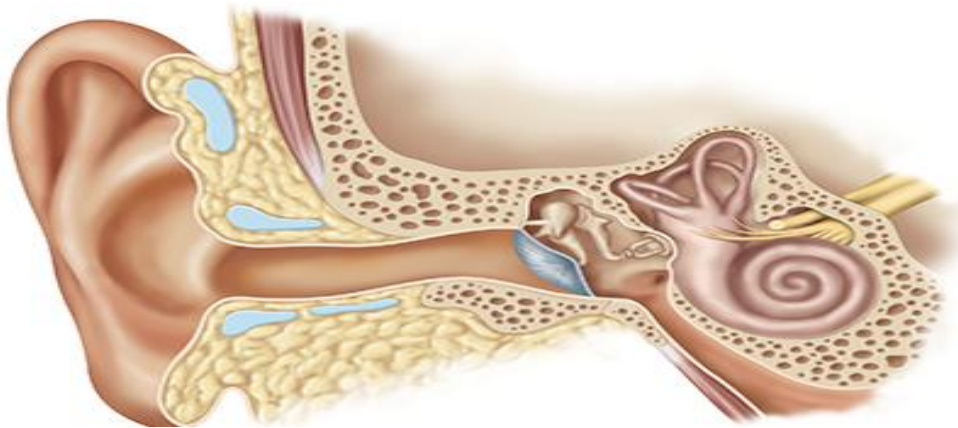
Tam olmayan bir silindir şeklindedir. Squamöz kemikle birlikte dış kulak yolu kemik duvarını oluşturur. Dış kulak yolunun ön, arka ve kısmen alt kısmını yapar. Timpanik kemik üst kısmı açık kalmış bir kelepçe gibidir. Bu açıklığa "Rivinius Çentiği" denir. Bu açıklığı squamöz kemik tamamlar. Squamöz kemiğin tamamlayıcı bu kısmına "Skutum" denir. Medial kısmı dar bir oluk şeklinde olan timpanik kemiğin bu dar kısmına "Sulkus Timpanikus" denir. Kulak zarının pars tensa kısmı buraya yerleşir. Pars flaksida ise bileziğin açık kalan kısmına yerleşir.³⁰

Mastoid kemikle timpanomastoid, squamöz kemikle de timpanosquamöz sütür hattı oluşturur. N.vagusun auriküler dalı olan "Arnold Siniri", juguler foramende n. vagustan ayrıldıktan sonra mastoid kanalikülüs denilen bir kanal ile stilomastoid foramenin süperiorundan fasiyal kanala girer. Timpanomastoid sütürden geçerek dış kulak yolu arka alt kısmına dağılır.³¹

İnferior yüzünde petröz kemikle petrotimpanik sütürü oluşturur. Aynı zamanda a.carotis internanın geçtiği foramen lacerumun yapısına da katılır. Karotis kanalının lateralindeki stiloid çıkıntısı oluşturur. Bu çıkıntının hemen posterior ve medialinde 7. kranial sinirin çıktığı stilomastoid foramen bulunur.³⁰

2.3. Kulak Anatomisi

Temporal kemiğin içine yerleşmiş olan işitme organı, her biri farklı yapısal ve fonksiyonel özelliklere sahip üç parçadan oluşur. Bunlar: Dış kulak, orta kulak ve iç kulak (Şekil 2).



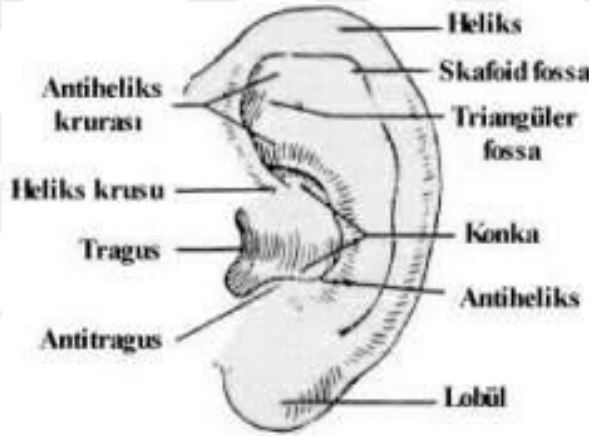
Şekil 2. Kulak anatomisi (anterior kesit)³²

2.3.1. Dış Kulak

Dış kulak; kulak kepçesi (aurikula, pinna), dış kulak yolu (meatus acusticus externus) ve timpanik membranın lateral yüzü olmak üzere 3 kısımda incelenir.^{29,33-35}

2.3.1.1. Kulak Kepçesi (Aurikula, Pinna)

Kafanın her iki yan tarafında yer alan, yaprağa benzeyen, ses toplayıcı ve sesin yönünü belirleyici özelliğe sahip bir organdır. Deri ve perikondrium ile örtülü ince, sarı, elastik kartilajdan oluşmuştur. Ön ve arka yüzü normal deri ile kaplıdır. Deri, ön yüzde daha sıkı yapışmıştır ve cilt altı dokulardan fakirdir. Arka yüz ise bunun tam tersi özelliktedir. Aurikula, üzerinde çeşitli girinti ve çıkıntıları olan bir organdır (Şekil 3).



Şekil 3. Kulak kepçesi (Aurikula, Pinna)³⁶

Heliks, aurikulanın dış kenarını belirler ve en yüksekteki parçasıdır. Heliksin tabanından aşağı doğru uzanan yapıya lobül denir. Lobülde kıkırdak bulunmaz, yağ ve deriden oluşmuştur. Konka; aurikulanın dış kulak yolunun kıkırdak bölümü ile devam eden inferior parçasıdır. Burada aurikuler kıkırdak, bir yarım daire hattı oluşturarak insisura terminalisi meydana getirir. İnsisura terminalisin ön sınırı, üçgen kubbe şeklinde bir kıkırdak çıkıntının oluşturduğu tragustur. Konkanın posterosüperioru antihelikstir. Bu çıkıntının köşeleri arasında triangüler fossa bulunur. Konkanın posterior ve inferiorunda antitragus bulunur.

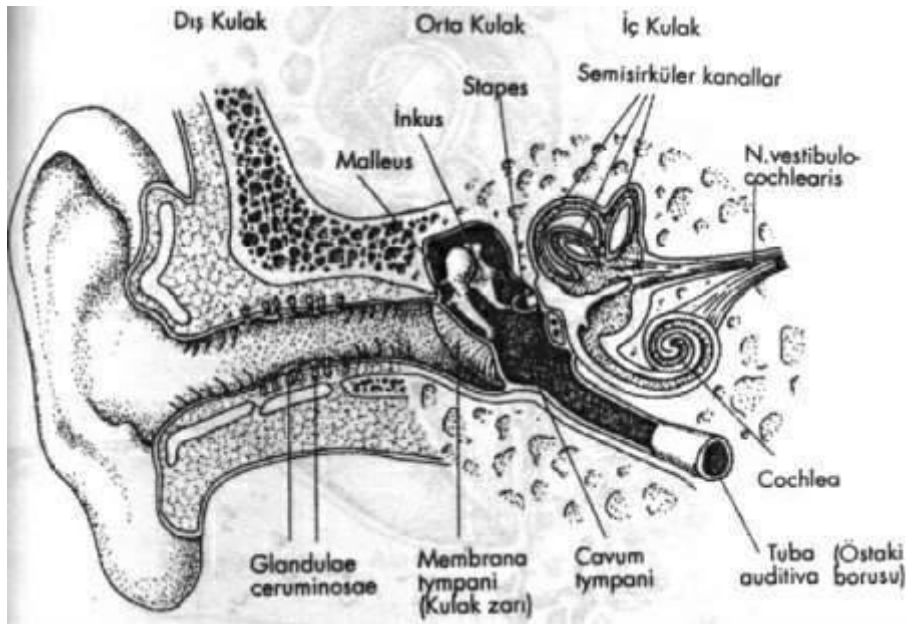
Deri, dış kulak yolu kıkırdağı, çeşitli ligamentler ve insanlarda fonksiyonunu yitirmiş olup n. fasiyalisten innerve olan kaslarla temporal kemiğin mastoid ve squamöz parçasına, 15-30 derecelik bir açıyla bağlanmaktadır.^{29,34,35}

Damarları: Arteriyel kanlanması a. carotis eksterna'nın dalları olan a. temporalis superficialis ile a. occipitalis posterior'dan gelir. Venler arterleri izler ve juguler vene drene olur. Lenfatikler preaurikuler, retroaurikuler ve infraaurikuler lenf düğümlerine dökülür.^{34,35,37}

Sinirleri: Aurikulanın sinir innervasyonu oldukça zengindir. V. kranial sinirin aurikulotemporal dalı, aurikula ön yüzünün büyük bir bölümünün duyarlılığını sağlar. Trigeminal sinirin mandibular dalından çıkan n. aurikulotemporalis dış kulak yolunun mandibular fossa ve tragus üzerindeki kıkırdak ve kemik kısmını inerve eder. Ayrıca VII. kranial sinirden kavum konka, konka, heliksin bir bölümü ve kulak arkasının alt kısmına duysal dallar gelir. Fasiyal sinir, eksternal meatusun posterior parçası ve aurikulanın konka seviyesine kadar olan kısmının duysunu taşır. Özellikle arka yüzün innervasyonu olmak üzere kulak kepçesinin büyük bir bölgesinin duysunu servikal ikinci ve üçüncü sinirler verir.³⁷ Üçüncü servikal sinirin dalı olan n. auricularis magnus; mastoid bölge derisi, kulak kepçesinin medial yüzü ile aurikulanın posterior bölümünün inervasyonunu sağlar.²²

2.3.1.2. Dış Kulak Yolu (Meatus Acusticus Externus)

Konkal kıkırdaktan timpanik membrana kadar olan uzunluğu içine alır.^{29,37} Yaklaşık 2.5 cm uzunluğundadır. Hafif "S" şeklinde oblik yerleşim gösteren dış kulak yolunun arka-üst duvar uzunluğu 25 mm iken, ön-alt duvar 31 mm'dir.^{34,37} (Şekil 4)



Şekil 4. Dış kulak yolu (Meatus Acusticus Externus)³⁶

Kıkırdak ve kemik olmak üzere iki bölümden oluşur. Dış kulak yolunun 1/3 lateral kısmını fibroelastik kıkırdak bir yapı oluşturur; 2/3 medial kısmı ise kemiksel yapıdadır. Kıkırdak parça arkada ve dış yanda, kemik kısım ise önde ve iç yanda bulunur.^{29,34,35,37,38} Çocuklarda temporal kemik gelişimi henüz tamamlanmadığı için kıkırdak kısmı daha uzundur.^{34,39} İsthmus bölgesi DKY kıkırdak ve kemik kısımlarının birleştiği yer olup DKY'nin en dar yeridir. DKY'ye kaçan yabancı cisimlerin en sık sıkıştığı bölgedir. DKY'deki ikinci darlık ise kemik kısımdadır. DKY'nin lateral kısmı posterosüperiora, medial kısmı ise anteroinferiora doğru yönelmiştir. Bu nedenle DKY'yi daha iyi gözleyebilmek ve DKY'nin S şeklini düzeltmek için aurikula'yı dışa, yukarıya ve arkaya çekmek gereklidir. Dış kulak yolu lateral 1/3'lük kıkırdak kısmını örten deri; ter, yağ, serömüsinöz bezler ve kıllar da dahil olmak üzere tüm deri eklerine sahiptir. Mediale doğru gidildikçe kemik kısmı örten deri ise oldukça ince olup hemen periostun üzerini örter; kıl, yağ ve serumen bezleri içermez.^{35,37-39}

Serüminöz bezler; apokrin ter bezlerinin değişik bir tipi olan kıvrımlı tübüler bezlerdir. Silindirik biçimli salgı hücrelerinde, çok sayıda kahverengi pigment granülü ve yağ damlaları bulunur. Duktusları derinin serbest yüzüne ve kıl follikülünün boyun bölümüne açılır. Salgısı serumen, kahverengi renkte olup balmumuna benzer. Koruyucu fonksiyonu vardır.

Dış kulak yolu kıkırdağı, arka-üst kısmı açık bir boru şeklindedir. Kıkırdak bölümün ön duvarında santorini incisuraları adı verilen iki adet fissür vardır. Bunlar dış kulak yolunun esnekliğini arttırmaları. Fakat enfeksiyonların yayılmasına da olanak sağlarlar. DKY enfeksiyonlarının parotise geçmesine ya da parotis tümörlerinin DKY'ye yayılmasına neden olur. Kemik kısmın anteroinferior bölümünde Huschke deliği yer alır.^{34,35,37}

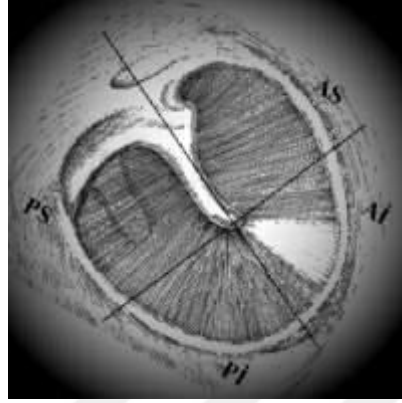
N. vagusun aurikular dalına "Arnold Siniri" denir. Bu sinir, dış kulak yolunun tabanının innervasyonunu sağlar. Kanala yapılan müdahalelerde öksürük refleksi meydana gelmesi ve orofarinks patolojilerine bağlı yansıyan kulak ağrısı oluşmasının nedeni budur.²²

Damarları: Dış kulak yolu arterleri; a. carotis externa'nın dalı olan a. auricularis posterior, a. temporalis superficialis ve a. auricularis profunda'dır. Venöz drenaj, maksiller ve eksternal juguler venler ile plexus pterygoideus'a olur. Lenfatikler; anterior, posterior ve inferior aurikuler lenf nodlarına drene olur.^{29,33,34}

Sinirleri: Dış kulak yolu duyu innervasyonu; inferior ve posterior bölümlerinde n. vagus'un auriküler dalı (çok küçük bir dal da glossofaringeal sinirden alarak) olan Arnold sinirinden, anterior ve süperior bölümlerinde ise n. mandibularis'in aurikulotemporal dalından olur.^{29,33,34}

2.3.1.3. Timpanik Membran (Kulak Zarı)

Timpanik membran (TM) elips şeklinde, yarı geçirgen ve sedef renkli, çok katlı, DKY'nun sonunda yer alan ve orta kulak boşluğunu DKY'dan ayıran bir perdedir. Kalınlığı 0,074 mm, horizontal uzunluğu 8-9 mm, vertikal uzunluğu 10-11 mm'dir.^{29,34,41-44} (Şekil 5)



Şekil 5. Timpanik membran (Kulak Zarı)³⁶

Kulak zarı dış kulak yolunu orta kulaktan ayırır. Dış kulak yolunun eksenine göre düzlemi anteroinferiora doğru eğilimlidir. Dış kulak yolunun süperior bölümü ile timpanik membran arasındaki açı 140 derecedir.⁴⁵

TM, orta kulağın dış duvarının büyük bir kısmını yapar. Sulkus timpanikusa oturur. TM'nin timpanik kemikte yerleştiği yer olan sulkus timpanikusa "Timpanik Halka" denir. Kulak zarı sulkus timpanikus içine "Gerlach Halkası" denen anulus fibrosus ile tesbit edilmiştir.^{36,44-46} TM anulus fibrozus (Gerlach halkası) ile timpanik halkaya, santral bir yapışıklıkla da malleusun kısa koluna ve manibrium malleiye bağlıdır.³⁷

Sulkus timpanikusu timpanik kemiğin iki uzantısı oluşturur; bu iki uzantı süperiorda birleşmezler ve burada oluşan açıklığa "Rivinius Çentiği" denilir. Rivinius çentiğini skutum denilen squamöz kemiğin uzantısı doldurur.

TM, anterior ve posterior malleolar ligamentler ile üstte pars flaksida ve altta pars tensa bölümleri olmak üzere iki kısımdan oluşur. Pars tensa TM'nin timpanik kemik içindeki parçasıdır. TM'nin büyük bir kısmını oluşturur ve ses dalgaları ile titreşen kısımdır. Pars flaksida (Sharpnell zarı) ise timpanik kemiğin iki uzantısı arasındaki açıklık olan rivinius çentiğini doldurur.

Bu iki parça arasında gerginlik farkı ve histolojik farklar söz konusudur. Pars tensada bulunan fibröz doku, pars flaksidada yoktur. Ayrıca pars tensa damar ve sinir yönünden daha

zengindir. Pars tensa translüsendir. Orta tabakasında kollajen lifler çoktur. Kenarlardaki liflerin kalınlaşması anulus fibrokartilajinosusu yapar. Pars flaksidada daha az kollajen lif bulunur, ancak daha kalındır ve fibröz anulus yoktur. Pars flaksida daha düşük yapısal kararlılığa sahiptir ve daha esnek olup basınç ve şekil değişikliklerine daha az dayanıklıdır.^{22,44}

TM'ı histolojik olarak dış yüzde DKY derisinin devamı olan squamöz epitel, iç yüzde orta kulak mukozasının devamı olan mukozal tabaka ve ikisi arasında yerleşmiş olan fibröz tabaka olmak üzere üç tabaka oluşturur. Pars flaksidada pars tensadan farklı olarak fibröz tabaka yerine damar ve sinirlerden zengin ince bir konnektif doku yer alır.^{35,37,45-47}

Pars tensa, ismini kompliyansından alır ve üç tabakadan oluşur. Dış tabaka, dış kulak yolu cildiyle devamlılığı olan ince bir cilt tabakasıdır. Ortadaki fibröz tabaka sirküler ve radyal liflerden oluşmaktadır. Sirküler lifler, fibröz tabakanın medial bölümünde yer alır. Bu lifler, kulak zarını temporal kemiğin sulkusuna bağlayan fibrokartilajinöz bir halka oluşturdukları periferik kısımda yoğunlaşmışlardır. Bu fibrokartilajinöz halka, pars flaksidanın temporal kemiğin squamöz kısmına bağlandığı rivinius çentiğinin olduğu yerde eksiktir. Radyal lifler ise fibröz tabakanın lateral kısmını oluşturur. Manibrium mallei'ye bağlıdır ve timpanik membranın anulusuna uzanır. Pars tensanın iç tabakası ise, orta kulak mukozasıyla devamlılığı olan mukozayla kaplıdır.⁴⁵

Timpanik membran konkavdır. Pars tensa'nın orta kısmında, yukarıdan aşağı doğru uzanan malleusun kulak zarı içerisinde yer alan parçası olan manibrium mallei parçası bulunur. Manibrium mallei'nin bitimindeki nokta şeklindeki görüntüye umbo denir.^{35,40} Umbo timpanik membranın medial apeksini yapar ve en çukur yeridir.^{22,44} Umbo'dan başlayarak öne ve aşağıya doğru timpanik membranın kenarına kadar ilerleyen üçgen görünüşündeki aydınlık alana "Politzer Üçgeni" adı verilir.⁴⁸

Pars tensa'nın medial yüzde orta kulak boşluğu ile komşuluğu olup, pars flaksida'nın ise attic bölgesi ile komşuluğu vardır.^{37,45,46}

Topografik olarak kulak zarı dört bölgeye ayrılmıştır. Manibrium mallei'den geçen bir çizgi ve buna dik umbo'dan geçen bir çizgi ile ön-üst, ön-alt, arka-üst ve arka-alt diye kadranlara ayrılır.

- Ön-üst kadran arkasında, östaki tüpünün ağzı ve tensor timpani kası bulunur.
- Ön-alt kadran arkasında, a. carotis interna'nın kanalı bulunur.
- Arka-üst kadran arkasında, inkusun uzun kolu, stapes ve oval pencere bulunur.
- Arka-alt kadran arkasında, promontorium ve yuvarlak pencere bulunur.

Damarları: Kulak zarı a. maxillaris interna'nın dalı olan a. auricularis profundus dalı, a. stilomastoidea ve a. timpanika ile beslenir. Venler içte pterigoid pleksusa, dışta v. jugularis eksterna'ya dökülür.

Sinirleri: Membranın dış kısmı V., IX. ve X. kranial sinirler tarafından, iç kısmı ise VII. ve IX. kranial sinirler tarafından innerve olur. Timpanik membranın iç kısmını ve timpanik kaviteyi, glossofaringeal sinirin Jacobson's dalı innerve eder. Tonsil, dil kökü ve retromandibular bölge ağrıları bu sinir aracılığı ile kulağa vurur.^{37,45,46}

2.3.2. Orta Kulak

Temporal kemikte lokalize, timpanik membran ile kemik labirent arasındaki, yüzeyi mukoza ile örtülü, hava içeren, düzensiz boşluktur (Şekil 6)⁴⁹. Nazofarinks ile bağlantıyı östaki borusu, mastoid kemik havalı hücreleri ile bağlantıyı ise aditus aracılığı ile sağlar.³⁵

Vibrasyonu timpanik membrandan iç kulağa hareketli kemikçik zinciri sayesinde iletir. Doğumda orta kulak gelişmesi tamamlanmıştır. Hacim olarak hemen hemen erişkindeki haline eşittir. Ortalama hacmi 0,5 cm³ kadardır. Vertikal ve anterosüperior çapları 15 mm, mediolateral derinliği üstte 6 mm iken umbo seviyesinde 2 mm'ye iner.³⁴

Orta kulak boşluğu pratikte 6 anatomik bölgeye ayrılarak incelenir.^{35,37,50,51}

- **Epitimpanum (Attik):** Fasiyal sinir timpanik bölümü ve timpanik membran üzerinde kalan kısımdır.

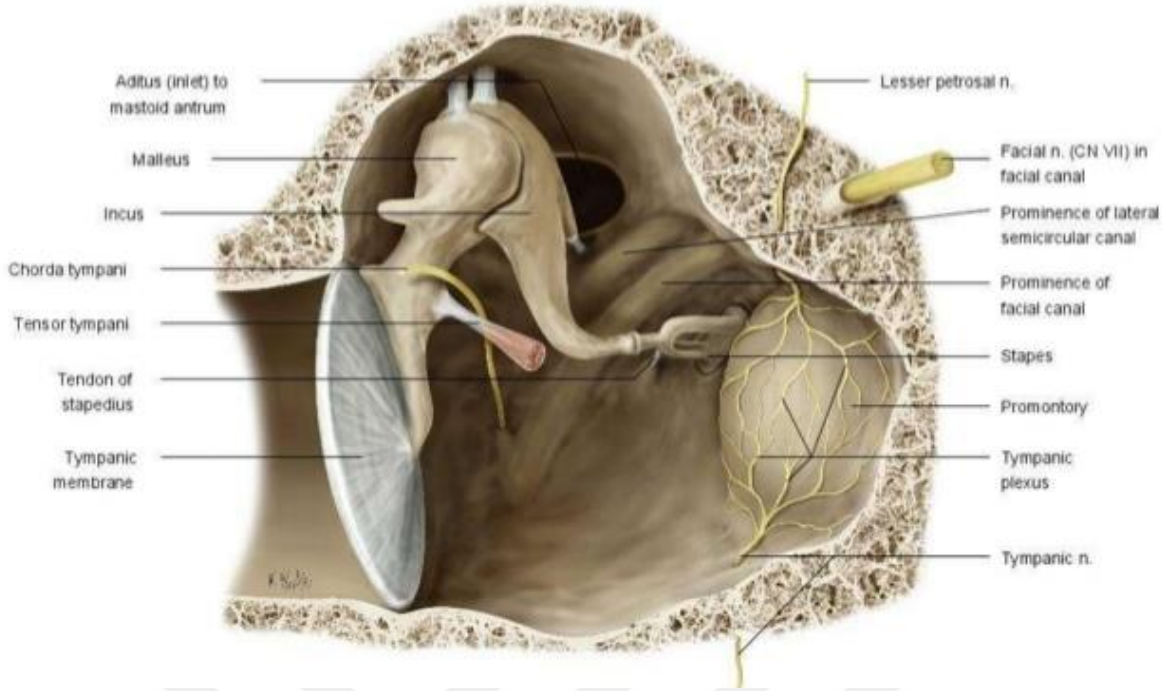
- **Mezotimpanum:** Timpanik membranın hemen medialine denk gelen kısımdır.

- **Hipotimpanum:** Sulkus timpanikus ve timpanik membranın altında kalan kısımdır.

- **Antrum:** Attığın hemen arkasında bulunur.

- **Aditus Ad Antrum:** Epitimpanumdan antruma doğru uzanan açıklıktır.

- **Mastoid sellüler yapı:** Orta kulak mukoperiostiumunun devamı olması nedeni ile timpan boşluğu yapıları arasında sayılır.



Şekil 6. Orta kulak⁴⁹

Epitimpanumda malleus başı, inkus boynu ve korda timpani bulunur. Hipotimpanum önemli bir yapı içermez.³⁶

Ortak kulağın küp gibi altı yüzeyi mevcuttur.

Üst duvar: Tegmen timpani oluşturur. Epitimpanumun tavanıdır. Orta kafa çukuru ile timpanik kaviteyi ayırır

Alt duvar: Hipotimpanumun zeminini oluşturur. Bulbus vena jugularis ve a. carotis interna ile komşudur. Arkada stiloid çıkıntı ile komşudur.

Dış duvar: Yukarıdan aşağıya doğru skutum, kulak zarı ve hipotimpanium olmak üzere üç kısımdan oluşur.

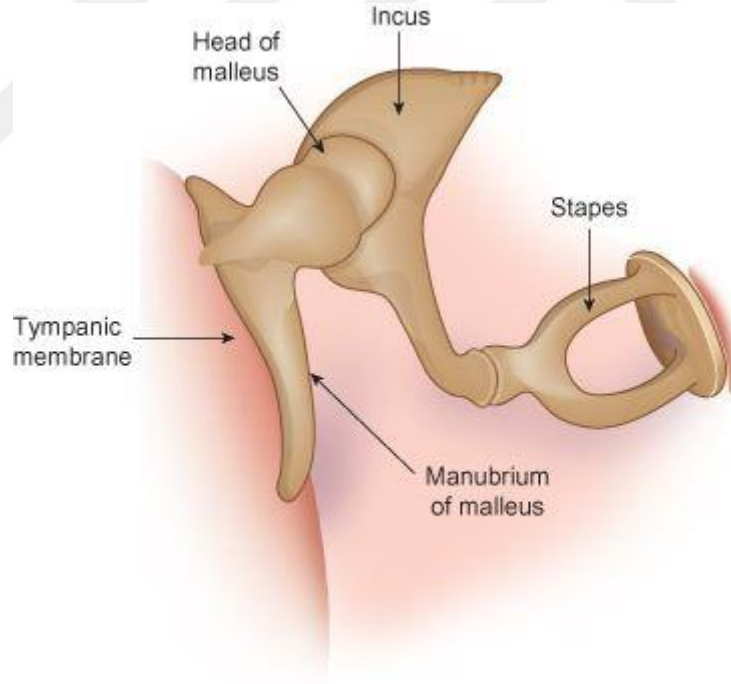
İç duvar: Orta kulağı iç kulaktan ayırır. Kokleanın bazal kıvrımının yan duvarının yaptığı kabarıklığa promontorium denir. Promontoriumun yaptığı çıkıntı vasıtası ile iç kulakla komşuluk gösterir. Promontorium üzerinde ikinci kulak zarı (membrana tympani secundaria) ile kaplı yuvarlak pencere (fossula fenestra cochlea) ve stapes tabanının yerleştiği oval pencere (fossula fenestra vestibuli) vardır.

Ön duvar: Arka altta internal karotid arterin yaptığı vertikal çıkıntı, östaki borusunun timpanik orifisi ve yarı kemik kanal olan tensör timpani kasının içinden geçtiği semicanalis m. tensor tympani bulunur.

Arka duvar: Orta kulak ile mastoid arasındaki duvardır. Üst parçasını aditus ad antrum yapar. Ortada, fallop kanalının inen parçası yer alır. Arka dış ve altta promontoriuma doğru uzanan küçük bir kemik çıkıntı vardır. Buna "Eminentia Piramidalis" denir. Stapes kası ve stapes tendonu buraya yapışır.

Eminentia piramidalise orta kulağın gizli köşesi adı verilir. Bu çıkıntıdan kulak zarına paralel giden dik bir düzlemde orta kulağı ikiye ayırdığımızda içteki bölümde 3 önemli yapı bulunur. Bunlar oval pencere, yuvarlak pencere ve sinüs timpanidir. Piramidal çıkıntının medialinde sinüs timpani yer alır. Sinüs timpaninin iç duvarını pontikulus, alt tarafını yuvarlak pencere, üstünü subikulum yapar. Eminentia piramidalis lateralinden korda timpani orta kulak boşluğuna girer. Eminentia piramidalis ile korda timpani arasında "Resessus Fasialis" denilen çukurluk vardır. Bu çukurun dış tarafını dış kulak yolu ve korda timpani, arka-üstünü ise fossa inkudis sınırlar. Fossa incudis içerisinde inkus kısa kolu yer alır.^{34-37,40,48,52}

Timpan zar ile iç kulak arasında yer alan üç tane hareketli kemikçik vardır: Malleus, inkus, stapes (Şekil 7).



Şekil 7. Kemikçikler⁵³

Malleus: Üç kemikçik içerisinde en büyük olanıdır. Dışta yer alır. Fetal hayatın 4. ayında gelişmeye başlar ve 6. ayda kemikleşmeyi tamamlar. Timpan zar ile ilişkide olup baş, boyun, manibrium, anterior ve lateral proçesten oluşur. Malleusun başı inkusun korpusu ile sinovyal eklem yapar. M. tensor timpani tendonu manibrium mallei'ye yapışır. Bu kas

manibriumu mediale çeker. Böylece timpanik membranı içe doğru çeker ve timpanik membranı gerer.

İnkus: Malleus ile stapes arasında yerleşir. Fetal hayatın 4. ayında gelişmeye başlar ve 6. ayında kemikleşme tamamlanır. İnkus; korpus, kısa kol ve uzun koldan oluşur. İnkus korpusu, malleus başı ile eklem yapar. Uzun kolun ucunda prosessus lentikularis denen ve stapes başı ile sinovyal eklem yapan bir kısım bulunur. Kısa kolu fossa inkudis'e yerleşir. İnkus süperior ligament ile epitimpanik resese, posterior ligament ile fossa inkudise bağlanır.

Stapes: Vücudun en küçük kemiğidir. Fetal hayatın 4. ayında kemikleşmeye başlar, 6. ayında kemikleşmesi tamamlanır. Baş, boyun, iki krus ve tabandan oluşur. Tabanın alanı 3.2 mm²'dir. Yüzeyi düz veya hafifçe konkav olup ligamentum annulare ile fenestra vestibüliye (oval pencere) tespit edilir. Arka krusun üstüne m. stapedius'un tendonu yapışır. Stapediovestibüler eklem basit fibröz bir eklemdir.

2.3.2.1. Östaki Borusu (Tuba Östaki)

Östaki borusunun yapısını, özelliklerini ve komşuluklarını ilk kez 1562'de İtalyan anatomist Bartolomeus Eustachius kendi tezinde açıklamıştır. Daha sonra faringotimpanik boru olarak tariflenen bu yapı, anatomi profesörü Antonio Valsalva tarafından, "Eustachian tube" olarak isimlendirilmiştir.⁵⁴

Timpanik kavite ile nazofarinks birleştiren 3-4 cm uzunluğunda huni şeklinde bir tüptür. Uzunluğu yetişkinde 31-38 mm, yenidoğanda 17-18 mm kadardır. Erişkinde nazofarinks tarafında kalan ön-iç 2/3 kısım kıkırdaktan, orta kulak tarafında kalan arka-dış 1/3'lük kısım ise kemikten oluşur. Fakat infantta, kemik kısım göreceli olarak daha uzundur.⁵⁵

Östaki tüpü hafif "S" şeklindedir. Kartilaj kısmındaki mukoza yüksek yalancı çok katlı silindirik epitel ile döşelidir. Kemik kısmındaki mukoza kartilaj kısmındakine benzerdir, ancak biraz daha kısa görünümündedir. Bebeklerde tuba östaki erişkinlerdekine göre daha kısa ve geniştir, aynı zamanda daha horizontal seyir gösterir. Tuba; iç tarafta karotis kanalının lateral yüzü, altta jugüler fossa ve kemik kanalının üstünde semikanalis m. tensör timpani ile komşuluk gösterir. Kemik kanal timpanik ağzında en geniştir. Gittikçe daralır ve en dar yeri istmus bölgesidir. İstmustan sonra kıkırdak bölümü nazofarinkse kadar genişleyerek ilerler. Tuba östaki normalde kapalı durur. Ancak çiğneme, yutma veya hapşırma sırasında açılır. Açılıp kapanmasından m. tensör veli palatini, m. levator veli palatini ve m. salpingofaringeus sorumludur. Nazofarinksteki ağzının açılmasında en fazla rolü m. tensör timpani oynar. Tuba östaki ağzının kapanması ise pasif olarak gerçekleşir.⁴⁶

Tuba östakinin innervasyonu IX. kraniyal sinirden kaynaklanan timpanik pleksustan olur. Korda timpani, lateral duvarı innerve eder. Tensör veli palatini kası X. kraniyal sinirden motor lifler alır. Damak yarığı olan çocuklarda m. tensör veli palatini kas fonksiyonu zayıf olduğundan tubaya ait sorunlar olması beklenir. Tuba östaki 6 kısma ayrılır.

- Faringeal bölüm
- Orta bölüm
- İstmus yanı
- İstmus
- Post-istmus
- Pre-timpanium

İnternal karotid arter tubanın değişik segmentleri ile ilişki gösterir. Arterin en yakın olduğu bölge pre-timpanium bölgesidir ve tubaya yakınlığı sadece 1 mm'dir.

Tuba östakinin başlıca 3 fonksiyonu vardır. Bunlardan biri nazofarinksteki havanın orta kulağa geçişine izin vererek orta kulağın ventilasyonu ve timpanik membranın iki tarafındaki basıncın eşit olmasını sağlamaktır. Diğer bir fonksiyonu, orta kulaktaki sekresyonların mukosilier aktivite ile nazofarinkse atılımını sağlamaktır. Son olarak bir de koruma fonksiyonu vardır; nazofarinksteki bakterilerin orta kulağa geçişine engel olur.^{29,37,45,46}

2.3.3. İç Kulak

Temporal kemiğin petröz parçası içerisinde yer alan, işitme ve denge ile ilgili reseptörlerin bulunduğu kısımdır.^{34,35,37} (Şekil 8) Yuvarlak ve oval pencereler aracılığı ile orta kulakla, koklear ve vestibüler aquaduktuslar aracılığı ile de kafa içiyle bağlantılıdır.^{35,37}

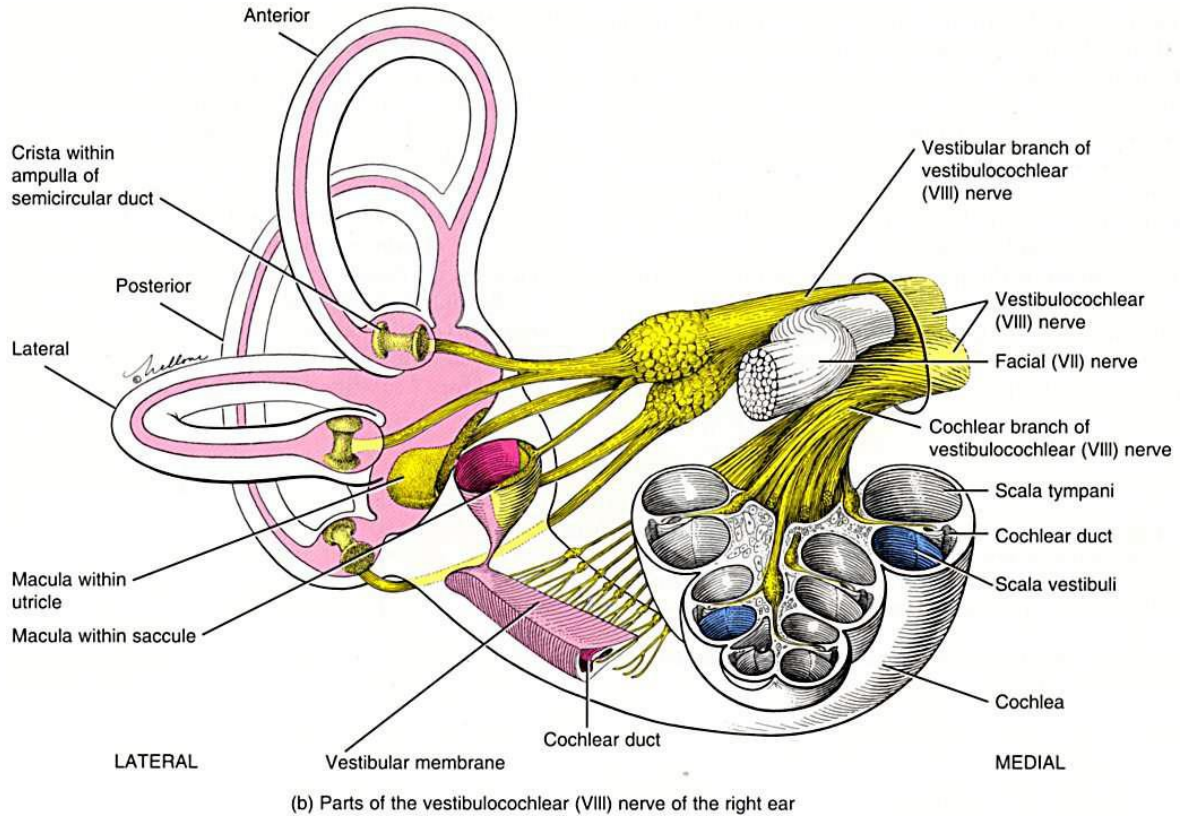
İç kulak, kemik (periotik) ve zar (otik) labirent olmak üzere iki kısımdan oluşur.^{35,48} Membranöz ve kemik labirenti içeren yapıya otik kapsül denir. Kemik labirent vücudun en sert kemiğidir.

Osseöz labirent (Kemik labirent): Semisirküler kanallar, koklea ve vestibülü içerir.^{34,37,40,48}

Membranöz labirent (Zar labirent): Koklea (pars inferior), vestibüler labirent (pars superior), endolenfatik sak ve duktus'tan oluşur.^{35,43} Kemik labirenti aynen taklit eder. Fakat kemik labirenti tamamen doldurmaz. Ancak 1/3 kısmını işgal eder. Zar ve kemik labirent arasında perilenf, zar labirent içinde ise endolenf bulunur.

Koklea: Modiolus denem eksen etrafında 2,5 ile 2.75 tur arasında dönüş yapan, 1-2 mm çapında, açıldığında 30-35 mm uzunluğunda olan spiral şeklinde kemik bir yapıdır.

Korti organı: Kokleanın duyuşal ve en önemli kısmıdır. Basiller membran üzerine yerleşmiştir. Vestibulokoklear sinir ile innerve olur. Vaskularizasyonu vertebrobasiler sistem ile gerçekteşir.⁵⁶



Şekil 8. İç kulak yapıları³⁶

2.4. Rat Kulak Anatomisi

Kulak zarı ve timpanik halkanın boyutları temporal kemiğin büyüklüğüne oranla insandakinden daha büyüktür.^{37,57}

Rat orta kulağı insan orta kulağındaki tüm anatomik yapıları içerir. Ratdaki kemikçikler insandakilere göre çok daha küçük olup yaklaşık çeyrek boydadır.⁵⁸ Rat orta kulak morfolojisi, Fleischer tarafından (1978) mikrotip organizasyon ortaya konularak tanımlanmıştır. Bu tasarımın iki ayırt edici özelliği vardır:

- 1) Malleus, gonial bone bölgesinde timpanik anulusa yapışıktır.
- 2) Malleus başı üzerinde orbiküler apofiz olarak adlandırılan geniş bir kütle vardır.

İnsanlarda, timpanik membran alanı $\sim 66 \text{ mm}^2$ dir. Oysa ratlarda yalnızca $\sim 11 \text{ mm}^2$ dir. Pars tensa ve pars flaksidanın rölatif boyutları da tamamen farklıdır. İnsanlar, timpanik membranın total büyüklüğü ile kıyaslandığında çok küçük bir pars flaksidaya sahip iken, ratlarda pars flaksida timpanik membranın 1/4 ila 1/3'ünü oluşturur.

Rat orta kulağının küçük bullası ve genellikle kapalı olan, horizontale yakın östaki tüpü (ÖT) vardır. ÖT mukozası, büyük yoğunlukta goblet hücreleri, daha az miktarda da muköz glandlar içerir.⁵⁹ Rat ÖT açılma basıncı insandakine benzerdir. ÖT iki ayrı silyalı ve sekretuar kanal yoluyla epitimpaniuma bağlıdır. Rat ve insan mukozası mukosilyer transport sistemi dağılımında benzerlik gösterir.⁶⁰ Rat orta kulağı temporal kemikte yerleşmiş ve iyi korunmuştur. Ancak timpanik membran muayenesi için sıradan bir otomikroskop ile kolayca ulaşılabilir. Rat orta kulağının üç boyutlu yapısı insaninkine benzer. Ancak mastoid hücreler yerine kavite tabanından çıkıntı yapan timpanik bulla mevcuttur.⁶¹ Pars tensa ve geniş pars flaksidası ile timpanik membran, lateral duvarın büyük kısmını oluşturur. Medial duvarda promontoryum, yuvarlak pencere, stapes ile birlikte oval pencere ve ÖT'nin timpanik ağzı yerleşmiştir. Silyalı ve sekretuar iki kanal dışında timpanik kavite basit, skuamöz-küboidal, silyasız epitel ile döşelidir. Patolojik koşullar esnasında bu basit epitel değişip, silyalı ve sekretuar hücreler kanallar dışında yüksek sayıda görülür.

Denge organı: Diğer memelilerde olduğu gibi, denge organı kemik labirentle çevrelenen membranöz labirenti içerir. Lateral semisirküler kanal laterale kıvrılır. Lateral semisirküler kanalın ampuller olmayan ucu bağlantıyı sağlamak için posterior kanalın ampuller ucuna ulaşır ve birleşir.

Utrikulus, bir tarafta anterior ve lateral kanalın ampullasının diğer tarafta commune krusun ve posterior kanalın ampullasının arasında iğ şeklinde vezikül (kese) gibi yerleşmiştir. Kaudal bölümün medial duvarından, endolenfatik kanal çıkar. Aquaductus vestibüli dorsale ve mediale ilerler. Bir valvle desteklenen orgine yakın bölgeden, sacculusa doğru ventromedial yönde ilerleyen ductus utrikulosakkularisi oluşturur. Makula utrikuli neredeyse sferik (küre) şekildedir. Utrikulusun ventrolateral duvarında yerleşmiştir. Yüzeyi dorsomediale yönlenmiştir. Sakkül laterale doğru yassılaşmıştır ve çapraz kesitte üçgen şeklindedir. Ductus reuniens 1mm uzunluğundadır. Kıvrık yüzeyi esasen laterale yönlenir.⁶¹

İşitme organı: Kokleanın eksenini daire tam olarak sagittal ve horizontal düzlemde yerleşmiştir. Membranöz kokleanın yapısı diğer memeliler gibidir.⁶¹ Ratlarda işitme aralığı 500 Hz ile 70 kHz arasındadır.⁶²

2.5. Botulinum Toksini

2.5.1. Tarihçesi

Botulinum toksini, bilinen en potent toksin olup anaerobik bir bakteri olan clostridium botulinumun ürettiği bir proteindir.¹ “Bacillus botulinus” adı verilen ve toksinin kaynağı olan bu anaerobik sporlu basilin ismi, ilerleyen zaman içinde değişerek “Clostridium botulinum” haline gelmiştir.⁶³ Bu toksin, sistemik bir besin zehirlenmesi olan botulizm nedeni olarak 19. yy da bulunmuştur.¹ Botulinum toksin zehirlenmesi ilk olarak 1817’de Justinus Kerner tarafından tanımlanmıştır. Prof.Dr. Van Ermengen ise daha sonra bu toksinin kaslarda paralizi yaparak ölüme sebep olduğunu bildirmiştir.⁶³

Besin kaynaklı botulizmin klinik semptomlarının tam ve doğru açıklaması ilk kez 1817 ve 1822 yılları arasında yayınlanmıştır.¹ Botulizm, botoks zehirinin klinik sendromu, toksin tanımlanmadan önce çok iyi biliniyordu. İsmi latince sosis kelimesinin karşılığı olan "botulus" dan gelir. Uzun bir dönem çürümüş sosislerin tüketilmesi ile ortaya çıkan özel bir hastalıkla anılmıştır.⁶⁴

Kerner 1820 yılında ‘sosis zehirlenmesi’ olarak isimlendirdiği botulizmin nedeni olan botulinum toksininin terapötik kullanımı ile ilgili fikri ortaya atmıştır. Binsekizyüzyirmiiki yılında ise bu hipotezini ve çalışmalarını bir yayın olarak özetlemiştir. Bu yayınında 155 botulizm vakasının klinik değerlendirmesi, hayvan çalışmaları, postmortem çalışmalar ve kendi üzerinde kahramanca yaptığı deneyler yer almıştır. Bu çalışmalarının sonucunda botulinum toksininin periferik motor, sempatik ve parasempatik sinir sistemlerinde sinyal iletimini engelleyerek etki gösterdiğini, fakat duyu iletimini etkilemediğini belirtmiştir. Modern tıptaki bilgilerimize uygun şekilde tüm otonomik ve müsküler semptomları tanımlamıştır.¹

Kerner, bu yazısının son bölümünde toksinin değişik hastalıklarda terapötik olarak kullanımının mümkün olduğunu, toksinin düşük dozlarda kullanıldığında sempatik sinir sisteminin aşırı aktivitesini azaltacağını, ayrıca vücut sıvılarının hipersekresyonunda, ter veya mukus salgılamasını azaltmada ve malign hastalıkların ülserlerinde kullanılabileceğini belirtmiştir.¹

Botulizm terimini kullanan ilk kişi 1870 yılında Müler olmuştur.¹ Van Ermengem, Belçika’nın bir köyü olan Ellezes’te 1895 yılında, pişmemiş jambon tüketiminin yol açtığı ölümcül besin zehirlenmesi epizodları tanımlamış⁶⁴, W. Kemper 1897’de botulizm için ilk antiserumu geliştirmiştir.⁶³

Yıllar içinde botulinum toksininin birçok tipi bulunmuştur. Botulinum toksin tip A (Btx A) 1920'li yıllarda Hermann Sommer tarafından purifiye edilmiştir. Hermann Sommer'in yaptığı bu çalışma, özellikle 2'nci dünya savaşı sırasında Btx A ve diğer B, C, D, ve E tipleri ile ilgili yapılan çalışmalara örnek olmuştur. Btx'un, biyolojik silah olarak kullanılma gibi potansiyel bir tehdit olması, askeri güçlerin de ilgisini çekmesine neden olmuştur. Bu nedenle btx ile çalışan risk altındaki araştırmacılarda ve askeriyede kullanılmak üzere toxoid aşı üretilmiştir.¹

1946'da Dr. Carl Lamana, Btx A'yı kristalize etmiş ve nontoksik proteinlere bağlı toksik ünitelerden meydana geldiğini göstermiştir. Burgen, Dickens ve Zatman 1949'da botulinum toksin tip A'nın etki mekanizması olan nöromusküler bileşkede asetilkolin salınımını bloke ettiğini tanımlamışlardır. 1950'lerde ise Dr. Vernon Brook, Btx A'nın hiperaktif kasların aktivitesinin azaltılmasında kullanılabileceğini önermiştir^{1,63}

Göz doktoru olan Dr. Alan Scott, 1960'lı ve sonrasındaki yıllarda, strabismusun alternatif tedavisi veya cerrahi tedavisine ek, olası tedavi yöntemi olarak kullanımı ile ilgili Fort Detrick çalışmasına katılmış olan zehir bilimci Dr. Edward Schantz ile görüşerek, birlikte çok sayıda hayvan çalışması yapmışlar.^{2,65}

Dr. Alan Scott ilk klinik uygulamayı ise 1973 yılında yapmıştır. Çeşitli hayvan deneyleri yaparak, Btx'un strabismus ve blepharospasm tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir.^{1,63} Gönüllü insanlarda ilk uygulama 1977 yılında başlamış.^{2,65} İlk enjeksiyonu 1977 yılında strabismuslu bir hastaya yapmış¹ ve 1980 yılında insanda Btx A ile strabismus tedavisinde ilk klinik deneyimlerini, bu konuda ilk olan bilimsel makale olarak yayımlamış.^{1,2,65}

Göz kapağı retraksiyonu, hemifasial spasm, tortikollis, nistagmus ve spastisite tedavisinde de 1982 yılında kullanmış.¹ Hemifasyal spazm, blefarospazm ve strabismus tedavisi için 1989'da ABD'de FDA (Food and Drug Administration) onayı ile kullanılmaya başlanmıştır.^{63,66} Bu dönemde botulinum toksininin kristal formu, Oculinum® (Inc., Berkeley, Calif.) ticari ismi ile piyasaya sunulmuş.⁶⁷

Btx A başarılı strabismus tedavilerinin ardından birçok oftalmolojik ve nörolojik hastalıkların tedavisinde, kozmetikte, maksillofasial, ortopedi, göğüs cerrahisi, dermatoloji, otolaringoloji, genel cerrahi, ağrı klinikleri, pediatri, rehabilitasyon üniteleri ve üroloji alanlarında da etkili bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Hatta hemifasiyal spazm, blefarospazm ve servikal distonilerde ilk adım tedavi olarak yerini almıştır. Yakın tarihte

kozmetikte ve lokalize otonomik bozukluklarda da yüksek derecede etkin olduğu kanıtlanmıştır. Migren, gerilim tipi baş ağrıları ve bel ağrılarında da kullanılmaktadır.^{1,7}

Botulinum toksini, submandibuler ve parotis bezlerine hipersalivasyon tedavisi amacıyla enjekte edilmekte, ayrıca tükürük bezi cerrahilerinden sonra gelişebilen tükürük fistüllerinde de kullanılmaktadır.⁷ Nörotoksinin diğer bir serotipi botulinum toksin tip B (Btx B) (Myobloc®), 2001 yılında servikal distonide kullanımı için, Amerikada ve Avrupa ülkelerinde lisans almıştır.¹

Btx'un klinikteki kullanım alanları bunlarla sınırlı kalmayıp, Amerikan Nöroloji Akademisi ve Amerikan Otolaringoloji Baş ve Boyun Cerrahisi Akademisi tarafından tanımlanmış endikasyon olmayan bir çok alanda kullanımı uygun bulundu. Bunun üzerine AAO-HNS komitesi Btx'un spazmodik disfoni, hemifasiyal spazm veya sinkineziler, servikal distoni, bazı orolingomandibular distoniler, Frey sendromu ve fasiyal kozmetik amaçlı kullanımında etkili ve güvenli olduğunu kabul etti.⁶⁸

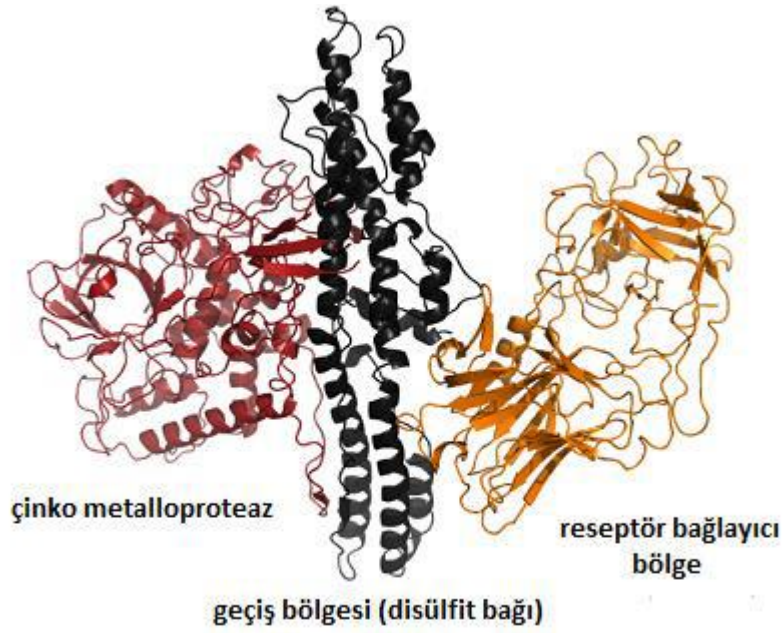
Nazal hipersekresyon tedavisindeki etkisinin değerlendirilmesi amaçlı 1995 yılında ilk kez köpekler üzerinde yapılan bir çalışmada; botulinum toksininin nazal uygulaması sonrasında rinorenin azaldığı görülmüş.⁶⁹ Bunun üzerine, 1998'de⁷⁰ ve 2001'de⁷¹ intrinsik rinit tedavisinde, 2003'te⁷² ise alerjik rinit tedavisinde ilk kez kullanılmıştır.¹

Btx tip A'nın kozmetik amaçlı kullanımı ise Jean Carruthers ve Alastair Carruthers tarafından ilk olarak sunulmuştur.⁶³

2.3.2. Fiziksel ve Kimyasal Yapısı

Botulinum toksini (Btx), gram (+), sporlu, anaerob bir basil olan Clostridium botulinum'un ekzotoksindir.⁷³

Btx 150 kD molekül ağırlığındadır. Polipeptid yapıda olan, molekül ağırlığı 100 kD olan ağır ve molekül ağırlığı 50 kD olan hafif zincir alt birimlerinden oluşmaktadır.⁷⁴⁻⁷⁹ Bu alt birimler disülfid köprüleri ile birbirine bağlanmış olup ısıya duyarlıdır. Ayrıca çinko bağlayıcı metalloendoproteaz içerir. Bu proteaz, toksinin aktif formuna dönüşmesinde rol alır (Şekil 9).



Şekil 9. Botulinum toksini kimyasal yapısı

Toksinin ağır zincirinde N (azot) ve C (karbon) terminalleri bulunmaktadır. N terminali hafif zincirin endozomal membrana geçişini sağlar. C terminali ise presinaptik reseptörlerin aracılık ettiği nörona bağlanmadan ve kolinerjik sistem terminaline affiniteden sorumludur.

Ağır zincir, toksinin periferik kolinerjik sinir uçlarına bağlanmasından sorumludur. Hafif zincir ise toksinin hücre içinde etkili olan kısmını oluşturmaktadır. Bu parça endozomal membran ile presinaptik membranın birleşmesinden sorumlu SNARE (soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor attachment proteine receptor) proteinlerine bağlanır.^{74,75,80}

Botulinum toksini kaynatılma sonrası bile varlığını sürdürebilirken, toksinin serbest hali 80°C (176°F)'nin üzerinde, 10 dakikadan fazla tutulduğunda parçalanır. pH'nın 7'nin üzerinde olduğu değerlerde de kolayca ortadan kalkar.⁸¹

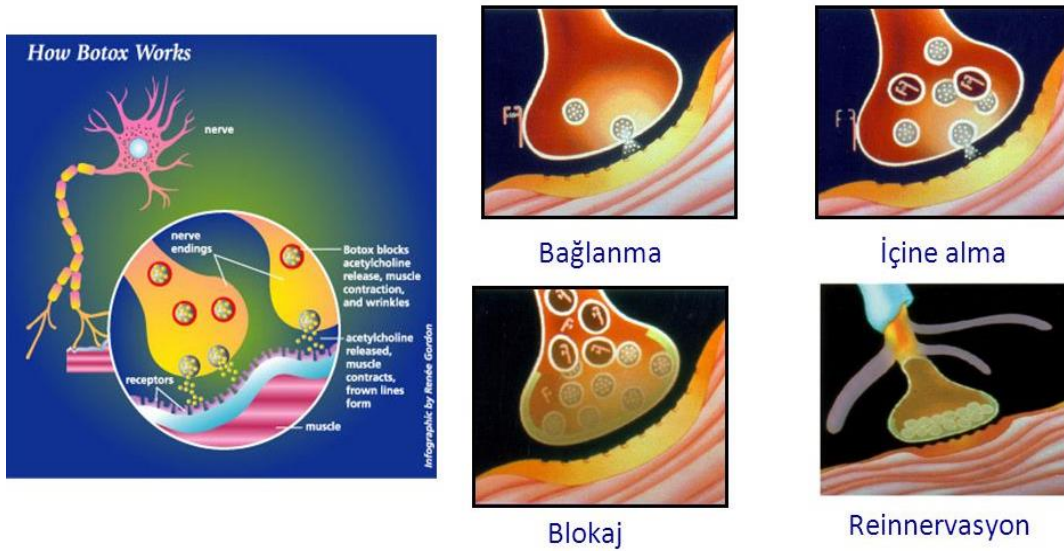
A, B, C1, C2 ve D'den G2ye kadar olmak üzere immünolojik olarak tanımlanmış toplam sekiz serotipi vardır.⁸⁰ Bu serotiplerin tümü farklı antijenik uyarı oluşturur ve nöronda farklı etki yönü vardır. Amerika Birleşik Devletlerinde sadece botulinum toksin tip A'nın (Btx-A) "Botox®" ticari adı altında (Allergan, Inc., Irvine, CA) klinik kullanım uygunluğu vardır. Kas dokusuna enjekte edilen btx'un bütün serotipleri, periferik sinir sisteminde nöromusküler kavşakların presinaptik terminal uçlarından asetilkolin serbestleştirilmesini inhibe ederek flask paraliziye neden olur.^{82,83}

2.3.3. Etki Mekanizması

Hücre sitoplazmasında yer alan SNARE proteinlerinin bir bölümü endozom membranına, bir bölümü de bunlara karşılık olarak presinaptik hücre membranına yerleşir. Kalsiyum kanalı aracılığı ile hücre içerisine kalsiyum girişi olur ve sintagmin proteininin katkısıyla membranların füzyonu gerçekleşir. Böylece asetilkolin sinaptik aralığa boşalır. Endozom; kltrin gibi kılıf proteinlerinin, membranı çevreleyip çukurcuk oluşturarak ve tomurcuklanarak vezikül oluşturması ile oluşur. Asetilkolin içeren sinaptik veziküller, endozomdan tomurcuklanarak meydana gelir ve asetilkolin havuzuna katılır. Daha sonra bu veziküller asetilkolinin sinaptik aralığa boşalması için birleşim ve füzyon aşamalarından geçer.

Btx, nöromusküler bileşkede presinaptik asetilkolin salınımı blokajı yaparak etki gösterir. Bu blokajın 4 temel aşaması vardır.^{1,83} (Şekil 10)

- 1- Presinaptik sinir yüzeyindeki reseptörlere hızlı, spesifik ve geri dönüşümsüz bağlanma
- 2- Vezikül içinde hücrenin içine alınma
- 3- Membran translokasyonu
- 4- Proteolitik toksin aktivitesi



Şekil 10. Botulinum Toksini Etki Mekanizması⁸⁴

Bağlanma, toksinin ağır zinciri aracılığı ile periferik kolinerjik sinir uçlarına olur. Spesifik ve geri dönüşümsüz bir bağlanmadır. Toksin molekülü endositoz ile ilişkili

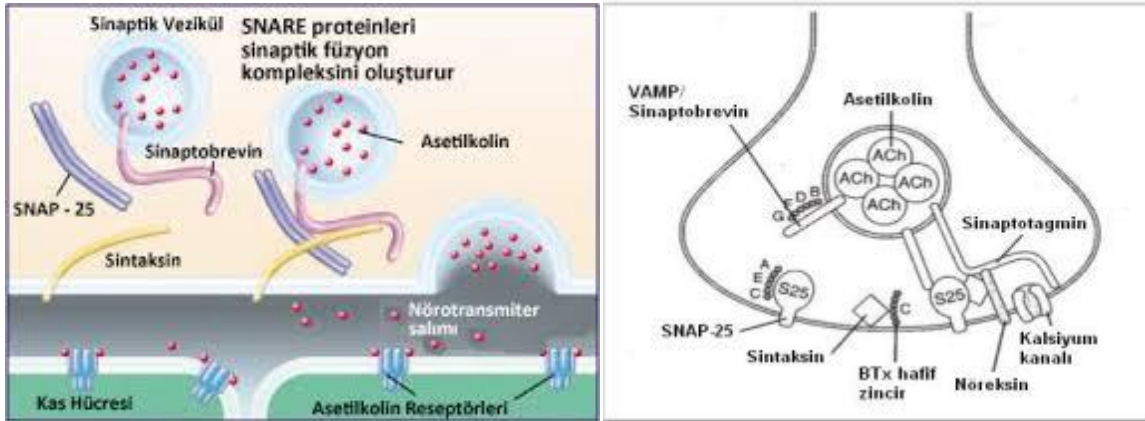
reseptörlere bağlanır. Bu bağlanma aşamasının ardından toksin veziküllere alınır ve reseptör bağımlı endositoz ile hücre içine girer. Veziküller hücre içine girdikten sonra toksinin ağır ve hafif zincirlerini bağlayan disülfid bağları kırılır. Toksinin hafif zincirleri, veziküllerin endozomun sitoplazmik yönünde translokasyonunu sağlar. Ağır zincirin N terminal ucu ise toksinin hücre içinde yer değiştirmesini sağlar. Toksin vezikül membranını geçerek sitozole salınır. Sitozole giren toksinin hafif zinciri, çinko bağımlı proteaz gibi davranarak, sinaptik füzyon kompleksini oluşturan ve asetilkolin ekzositozunda rol oynayan SNARE reseptör kompleksinin üç proteininden birini böler. Böylece sinir uçlarından nörotransmitter salınımını engeller.⁷⁴⁻⁷⁸

SNARE protein kompleksi üç temel yapıdan oluşmaktadır. Bunlar; sinaptobrevin (VAMP= Vesicle associated membrane protein), SNAP-25 (25 kD sinaptozom ilişkili protein) ve sintaksin'dir. Botulinum toksininin her bir serotipi farklı proteini ayırır. Bu nedenle her serotipin spesifik etki yönü vardır (Şekil 11)⁸⁵.

Serotip A, C ve E: Hedefi 25 kD moleküler ağırlıktaki sinaptozom ilişkili proteindir. Bu protein genellikle SNAP-25 olarak adlandırılır.

Serotip C: SNAP-25'i ayırmanın yanında primer olarak sintaksin üzerinden etkili olur.

Serotip B, D, F ve G: Sinaptobrevin (VAMP) proteinini geri dönüşümsüz olarak bloke ederek etki gösterir.^{1,76-79,82,86-91}



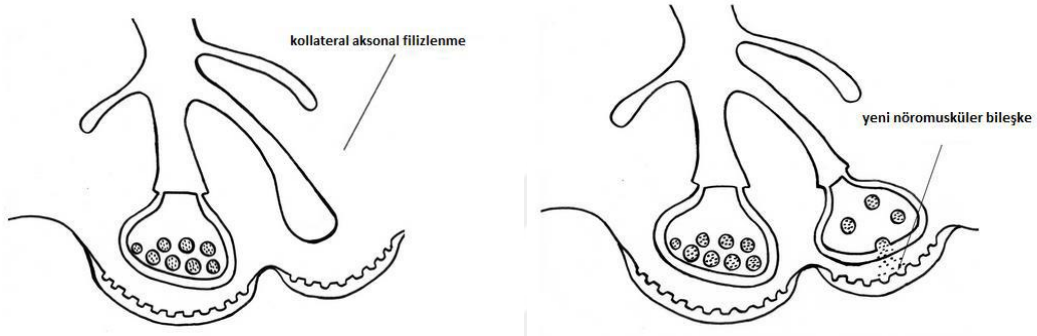
Şekil 11. SNARE protein kompleksi ve botulinum toksin serotipleri⁸⁵

Az miktarda lokal olarak yapılan botoks, enjeksiyon yapılan bölgede kolinerjik motor sinir uçları tarafından tutulur ve nöromusküler blokaja neden olur. Böylece toksin, sistemik etki yapmadan lokalize paralizi yapar. Yeni motor sinir dallarının gelişmesi sonucu toksinin etkileri kaybolur.⁷⁴

İyileşme iki farklı fazda görülür.^{86,92}

1. Öncelikle kollateral aksonal filizlenme oluşur. Bu sinir terminalleri motor son plak bölgesinin genişlemesine yol açıp yeni bir nöromüsküler bileşkenin oluşmasını sağlar. Bu yeni kollateral aksonlar 28 günde iyileşir ve bütün nöronal iletim, yeni oluşan aksonlar aracılığı ile olur (Şekil 12).

2. Zamanla yeni oluşan aksonal filizlenmelerin sinaptik fonksiyonlarının kaybı gözlenir. Bu yaklaşık 91 gün sonra tamamlanır. Bu da botoks aktivitesinin klinik kaybı ile ilişkilidir. Bu aşamada orijinal ana terminaller nöronal iletimi yeniden kazanır (Şekil 12)



Şekil 12. Botoks aktivitesinin sonlanma aşamaları (Solda aksonal filizlenme, sağda sinir terminallerinin yeni fonksiyonel nöromüsküler bileşkeyi oluşturması)⁸⁴

A serotipi ile C serotipinin etki süresi birbirine benzer. Diğer serotipler için (B,E,F) bu süre daha kısadır.^{89,93,94}

Botoks; asetilkolinin sentezini, depolanmasını ve sinirlerdeki elektriksel iletiyi bozmaz. Uzun süreli kullanımında ise, geri dönüşümlü denervasyon atrofisi meydana gelir. Ayrıca botoksun duyuşal sistem üzerinde analjezik özelliğı olduğı da bildirilmiştir.^{88,95}

2.3.4. Kullanım Alanları

Son 20 yılda çok geniş kullanım alanı bulan botulinum toksini, spazmodik disfoni, akalazyaya, çeşitli hiperkinetik-distonik bozukluklar (blefarospazm, hemifasiyal spazm, spazmodik tortikollis, fokal distoniler gibi), anal fissür, oddi sfinkter spazmı, parkinson tremoru, sinkinezi, hiperhidrozis, migren tipi baş ağrısı, tetanoz^{96,97}, erişkin ve çocuklarda üst motor nöron sendromuna bağılı gelişen spastisite tedavisinde (serebral palsy, spinal kord yaralanması, travmatik kafa yaralanması, stroke, nörodejeneratif hastalıklar, multipl skleroz)⁸⁷, nistagmus, kekemelik, hiperaktif çiğneyici kaslar (özellikle masseter hipertrofisi), hipersalivasyon, spastik mesane, aşırı idrar kesesi aktivitesi, bruksizm (TME bozukluğu),

perioperatif ve postoperatif ağrı kontrolü, mandibulanın öne alındığı ortognatik cerrahi operasyonlarda relapsı önlemek için EMG kontrollü geniohyoid kasın paralizisi, mandibular kondil fraktürlerinin kapalı redüksiyonla tedavisinde⁹⁸ kullanılmaktadır. Ayrıca son yıllarda çok yaygın olarak yüz kırışıklıkları, fasyal asimetri gibi kozmetik problemlerin tedavisinde de kullanımı yaygınlaşmıştır.

Botoks, KBB pratiğine spazmodik disfoni ve larinksi etkileyen fokal distoni tedavisi ile girmiştir. Distoni; bir organa, kasa veya kas grubuna sınırlı ya da generalize olabilen, santral motor işlemlerle karakterize, müsküler spazmlardan meydana gelen kronik nörolojik bir hastalıktır. Larinkste; addüktör ve abdüktör, yani glottik kapanmaya veya açılmaya neden olan spazmlar olarak ikiye ayrılmıştır.

Botulinum toksini spazmodik disfonide, orbikülaris oküli kası ve servikal kasları tutan fokal distonilerdeki umut verici bulguları nedeniyle denenmiştir. Larinks içine enjeksiyon, laringeal EMG aracılığı ile ilk kez 1984 yılı nisan ayında uygulanmıştır.⁹⁹ O tarihten sonra btx, spazmodik disfoni tedavisinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Bugün btx, Amerikan Otolaringoloji ve Baş-Boyun Cerrahi Akademisi tarafınca bu hastalıklarda primer tedavi yöntemi olarak onaylamıştır.⁶⁸

Botoks spazmodik disfoni tedavisindeki başarısına paralel olarak meige sendromu, izole oromandibüler distoni, blefarospazm, tortikolis, ve laringeal solunum distonisi gibi diğer fokal ve segmental distoni tedavilerinde de kullanılmıştır.¹⁰⁰⁻¹⁰²

Botulinum toksin-A, vazospastik hastalıklarda da kullanılmaktadır. Bu alandaki etkinliği tesadüfen bulunmuştur. 2003 yılında tanımlanamamış bağ doku hastalığı olan bir hastaya palmar hiperhidrosiz nedeni ile botulinum toksin-A enjeksiyonu yapılmış. Hastanın uygulama sonrasında reyno fenomenine bağlı ağrılarında azalma ve parmak uçlarındaki ülserlerde iyileşme olduğu görülmüştür.^{103,104} Van Beek 2007'de reyno fenomeni olan 11 hastanın ellerine botoks enjeksiyonu yapmış, araştırma sonucunda hastaların ağrılarında belirgin azalma, atak sıklığında azalma ve parmak uçlarındaki ülserlerde iyileşme olduğunu tesbit etmiştir. Bunun üzerine botoksun düz kas hücrelerinde nöromüsküler blokaj yaparak vazodilatasyona neden olduğunu savunmuştur.¹⁰⁴

Morris 2001 de domuz uterin arterinde botulinum toksin-A'yı denemiş ve sempatik vazokonstriksiyonu engelleyerek kimyasal sempatektomi yaptığını göstermiştir.¹⁰⁵

Sycha 2004 yılında, pilot çalışma olarak reyno hastalığı olan iki hastada botoks kullanmıştır.¹⁰⁶ Neumeister 2009 yılında, botoksun nörepinefrin, glutamat, substans-P, kalsitonin gen ilişkili protein gibi ağrı ile ilgili nörotransmitterleri etkilediğini varsayarak iskemik parmaklara botoks uygulamış ve botoksun bu nörotransmitterlerin salınımında bloğa

neden olarak sempatik stimölasyonu ve ağrıyı azalttığını göstermiştir. Böylece botoksun iskemik parmaklarda vaskülariteyi düzelttiğini öngörmüştür.^{105,107}

Wheeler de botoksun ağrı tedavisinde kullanımı ile ilgili yaptığı bir çalışmada, bu etkiden, substans-P gibi ağrı mediatörlerinin salınımında azalma olmasını sorumlu tutmaktadır. Bu etkisinden dolayı botoksun kas, iskelet sistemi ağrılarında, eklem ağrılarında, inme sonrası omuz ağrılarında, boyun disseksiyonu ve/veya boyuna radyoterapi sonrası boyun ağrılarında, nöropatik ağrılarda, ürolojik ve pelvik ağrılarda kullanılabileceğini belirtmiştir.¹⁰⁸

Son yıllarda botulinum toksininin klinik pratikte artan bir kullanım alanı da migren tipi baş ağrılarıdır.¹⁰⁹

Botulinum toksininin en dikkat çekici kullanım alanı ise psikolojik hastalıklarda olan kullanımıdır.¹¹⁰ Bu alandaki etkisi, beyinin vücutta ne olup bittiğinden daimi olarak haberdar olduğu hipotezine, yani "bir insan zorla olsa dahi gülümsemeye zorlanırsa, psikolojik durumu düzelme gösterecektir (facial feedback hypothesis)" hipotezine dayanıyor.¹¹¹ Havas ve ark. botoks enjeksiyonu öncesi ve sonrasında, hastalara duygusal içerikli cümleler (sinirli, mutsuz ve mutlu) okutmuştur. Enjeksiyon sonrası mutsuzluk ve sinirlilik içeren cümlelerin daha yavaş okunduğunu ama mutluluk içeren cümlelerin okunma süresinin değişmediğini göstermiştir.¹¹² Bir başka çalışmada da, botoks ile tedavi edilen hastalarda tedaviye serum fizyolojik ile devam edilmesine rağmen psikolojik durumdaki düzelmelerin devam ettiği gösterilmiştir.¹¹³

Tablo 1. Botulinum Toksininin Klinikte Kullanım Alanları

Botoks Kullanım Alanları			
1- Fokal distoniler	2-Diğer istemsiz hareketler	3-Uygun olmayan kontraksiyonlar	4-Diğer potansiyel kullanım alanları
• Blefarospazm • Servikal distoni (tortikollis) • Laringeal distoni (spazmodik disfoni) • Oromandibular-fasiyal- lingual distoni • Mesleki kramplar • Diğer fokal distoniler (idiopatik, sekonder)	• Palatal miyoklonus • Hemifasiyal spazm • Tikler • Tremor	• Nistagmus • Strabismus • Bruksizm (TME bozukluğu) • Kekemelik • Gerilim baş ağrıları • Spastik mesane • Akalazya • Miyokimi • Lumbosakral strain ve dorsal spazmlar • Spastisite • Diğer spastik bozukluklar	• Protektif ptozis • Otonom sinir sistemi • Kozmetik (kırıxıklıklar, fasiyal asimetri)

2.3.5. Yan Etkileri

Enjeksiyon yapılan bölgede lokal ağrı, ekimoz, ödem, kanama ve enfeksiyon olabilir. Halsizlik, yorgunluk, baş ağrısı, grip benzeri bir durum da bildirilmiştir. Deride kuruma, pullanma, geçici hiperestezi, ağız kuruluğu hissi görülebilir. Yüze yapılan enjeksiyonlar sonucu, hayatı tehdit eden allerjik reaksiyonlar görülmemiştir. Nadiren erken dönemde enjeksiyon yapılan kaslarda güçsüzlük, blefarospazm ve hemifasiyal spazm tedavisi sonrasında pitozis, vertikal kayma, diplopi, kuru göz, lagofthalmi, epifora, nadiren ektropiyon, entropiyon, keratit ve korneal perforasyon bildirilmiştir.¹¹⁴

Frontal bölge enjeksiyonları sonrasında kaş asimetrisi, kaş pitozisi ve kaşa kontur anomalileri olabilir. Spazmodik tortikollis tedavisi sonrasında disfaji, lokal zayıflık ve semptomatik genel zayıflık görülmüştür. Bunun nedeninin kas güçsüzlüğü veya otonomik disfonksiyon olabileceği düşünülmektedir.¹¹⁵

Botoks, hedef dokudan atıldığında ya da yanlışlıkla damar içine enjekte edildiğinde sistemik yan etkiler oluşabilir.¹¹⁶ Kullanılan standart dozlarda ciddi yan etki görülme insidansı oldukça nadirdir. Objektif güçsüzlük olmaksızın genel bir halsizlik hali gelişebilir. İmmün mekanizmalara bağlı olarak gelişen brakial pleksopati veya influenza benzeri hastalık, diğer sistemik yan etkilerdir.¹¹⁷ Otonomik disfonksiyona bağlı olarak safra kesesi disfonksiyonu, paralitik ileus, gastrik dilatasyon veya hipotansiyon gelişebilir.^{114,117}

Yapılan hayvan ve insan çalışmalarında karsinojenik ve immünolojik yan etkiler tespit edilmemiştir.^{118,119} Çocuklarda güvenilirlik ve etkinliği kanıtlanamadığından gebelik ve emzirme dönemlerinde kullanımı önerilmemektedir.¹²⁰ Teratojenitesi hakkında kesin bir bilgi yoktur. Ancak gebelik kategorisi içinde C kategorisinde bir ajan olarak kabul edilmektedir.^{121,122}

Botoks enjeksiyonunun avantajları; uygulama kolaylığı, sistemik yan etki azlığı, duyuusal etkilenim yapmaması, etkilerinin 2-3 ayda geriye dönüşümlü olmasıdır. Pahalı olması ve toksine karşı antikor gelişme ihtimali ise bazı dezavantajlarıdır.¹²³

Tekrarlanan tedavilerden sonra bazı hastalarda, botoksa karşı varlığı gösterilen antikorlar ve yeni akson terminallerinin gelişimi, botoks enjeksiyonunun beklenen etkisine karşı klinik direnç oluşmasına neden olmaktadır.^{79,124} Nötralizan antikor gelişimi %5'den az oranda görülebilmektedir. Enjeksiyon dozu ve sıklığının artması, enjeksiyonlar arasının 12 haftadan daha kısa tutulması, tekrarlanan dozların 300 üniteyi aşması durumunda antikor gelişme riski artabilir.^{116,125,126}

Botulinum toksin-A'nın toksik dozu, insan zehirlenmesi için 3500 ünite iken, 30000 ünite ağır zehirlenmeye neden olur. İnsan için LD50'nin 30-40 ünite/kg olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.¹²⁷

2.3.6. Preparatları ve Farmakolojik Özellikleri

Clostridium botulinum'un fazla miktarda toksin üreten suşlarından kültür yapılarak tedavi amaçlı kullanılan botoks üretilir. Üretilen toksin ayrılır, çöktürülür, saflaştırılır ve amonyum sülfatla kristalize edilir. Bunlar sonucunda saflaştırılmış toz halinde nörotoksin kompleksi elde edilir. En sık kullanılan preparatlar "Botox® ve Dysport®" dur. Botox® -5°C de, Dysport® +2-8°C'de saklanmaktadır. Her ikisi de serum fizyolojik ile sulandırıldıktan sonra +2-8°C'de aseptik şartlarda korunmalıdır. Btx rehidrasyonunun serbest koruyucu madde olan normal saline (%0.9) ile yapılması gerekmektedir. Koruyucu madde toksini etkisiz hale getirebilir. Aşırı çalkalamak, köpürtmek veya aşırı soğuk ortam, solüsyondaki toksini denatüre edebilir. Bu nedenle oldukça dikkatli ve nazıkçe serum fizyolojik solüsyonu flakon iç duvarına doğru verilmelidir.¹²⁸⁻¹³⁰

Bir ünite Botox®, Avrupa 'da kullanılan Btx-A preparatı olan bir ünite Dysport® (Maidenhead, UK) ile eşdeğer değildir. Ayrıca etkinliğinde de farklılıklar olabilir.

Sulandırılmış bir flakon Botox® 100 U botulinium toksini içerir ve bir kişiye uygulama için yeterli gelir. Botox®, 1-10 ml serum fizyolojik ile seyreltilerek kullanılabilir. Buna göre 2,5 ml serum fizyolojik ile seyreltilen Botox®, 0,1 ml'de 4 ünite toksin içermektedir. +4°C'de saklanan sulandırılmış Botox® preparatlarının etkinliği 1. günün sonunda %90-100, 3. gün %70-80, 7. gün %40-50, 14. günde minimal düzeyde bulunmuştur. Sulandırıldıktan sonra buzdolabında 1 günden (24 saat) fazla tutulmaması ve buzdolabının dondurucu kısmında hiç saklanmaması önerilmektedir.^{129,130}

Botoks enjeksiyonundan sonra, toksinin hücre içinde aktivitesinin başlaması ile klinik etkilerinin görülmesi 3-5 gün içinde olmaktadır. Maksimum etkisi ise yaklaşık 30. günde görülür.^{131,132}

Botulinum toksin-A, enjeksiyon yapılan bölgede 3 cm kadar çevresindeki cilde yayılabilir.^{131,133} Hiperhidrozis tedavisinde uygulandığı gibi 1 cm aralıklarla "elek düzeni" şeklinde yapılan enjeksiyon, geniş alana yapılacak uygulamalar için örnek olabilecek bir uygulamadır.^{134,135}

2.3.7. İlaç Etkileşimleri

Aminoglikozidler (gentamisin), D-penisilamin, siklosporin, kinidin, kürar tipi nondepolarizan blokerler, süksinilkolin gibi kas gevşeticiler, magnezyum sülfat, aminokinolonlar ve linkozamid gibi ilaçların çoğu nöromuskuler kavşakta inhibisyona neden olur ve botoksun etkilerini arttırırlar. Hidroklorokin ve klorokin gibi aminokinolonlar ise hücre içerisinde botoks ile etkileşime girip toksinin etkisini inhibe ederler.^{118,120}



3. MATERYAL ve METOD

Çalışma Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz ve Patoloji Anabilim Dalları tarafından Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Kurulu desteği alınarak yapıldı.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışma Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinde yapıldı. Çalışma öncesi Başkent Üniversitesi Araştırma Kurulu ve Hayvan Deneyi Etik Kurulu'ndan onay alındı (proje no DA16/24). Çalışmaya toplam 48 adet ortalama 300 gr ağırlığında Sprauge Dawley (48 dişi) erişkin rat dahil edildi. Deney hayvanları Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinde ilaç uygulama zamanları haricinde sıcaklığı 22 ± 2 °C'de, nemi %45-65 oranında korunan ve 12 saat aydınlık-12 saat karanlık, serbest yemek ve su alabildikleri bir ortamda tutuldu.

3.2. Gruplar

Ratlar;

Grup I: (n=24) Topikal botulinum toksini uygulaması sağ kulak, kontrol sol kulak,

Grup II: (n=24) İntrakütanöz botulinum toksini uygulaması sağ kulak, kontrol sol kulak olmak üzere 2 ana guruba ayrıldı.

Bu iki ana grup kendi içinde alt gruplara ayrıldı:

Grup I;

Grup Ia: (n=8) Topikal botulinum toksini uygulaması sonrası 10. günde inceleme,

Grup Ib: (n=8) Topikal botulinum toksini uygulaması sonrası 30. günde inceleme,

Grup Ic: (n=8) Topikal botulinum toksini uygulaması sonrası 30. günde ikinci doz topikal botulinum toksin uygulaması ve ikinci dozun 10. gününde inceleme olmak üzere 3 alt gruba ayrıldı.

Grup II;

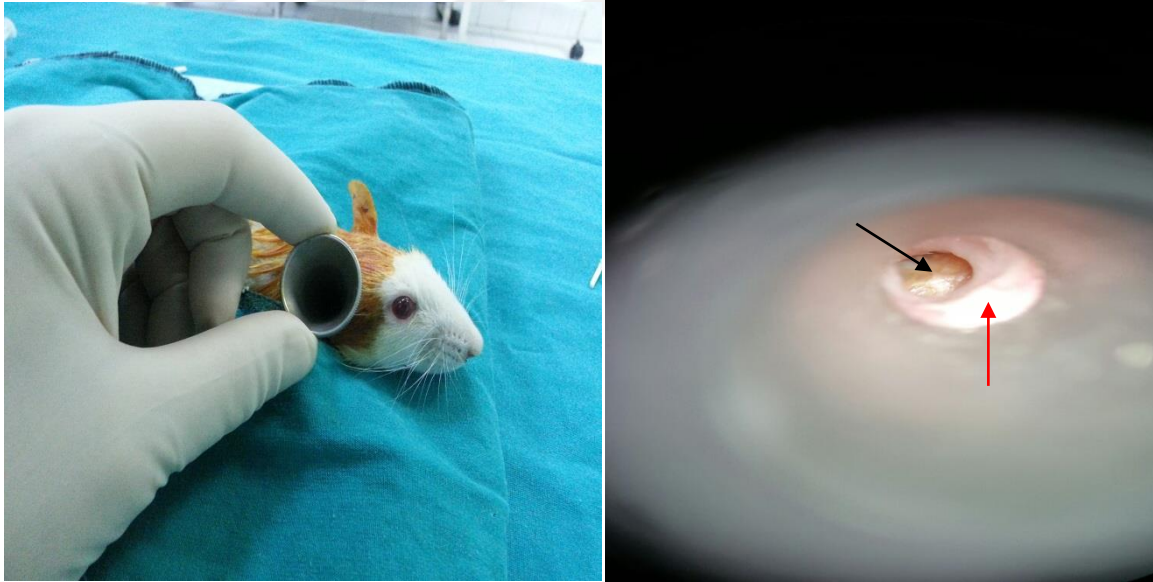
Grup IIa: (n=8) İntrakütanöz botulinum toksini uygulaması sonrası 10. günde inceleme,

Grup IIb: (n=8) İntrakütanöz botulinum toksini uygulaması sonrası 30. günde inceleme,

Grup IIc: (n=8) İntrakütanöz botulinum toksini uygulaması sonrası 30. günde ikinci doz intrakütanöz botulinum toksin uygulaması ve ikinci dozun 10. gününde inceleme olmak üzere 3 alt gruba ayrıldı.

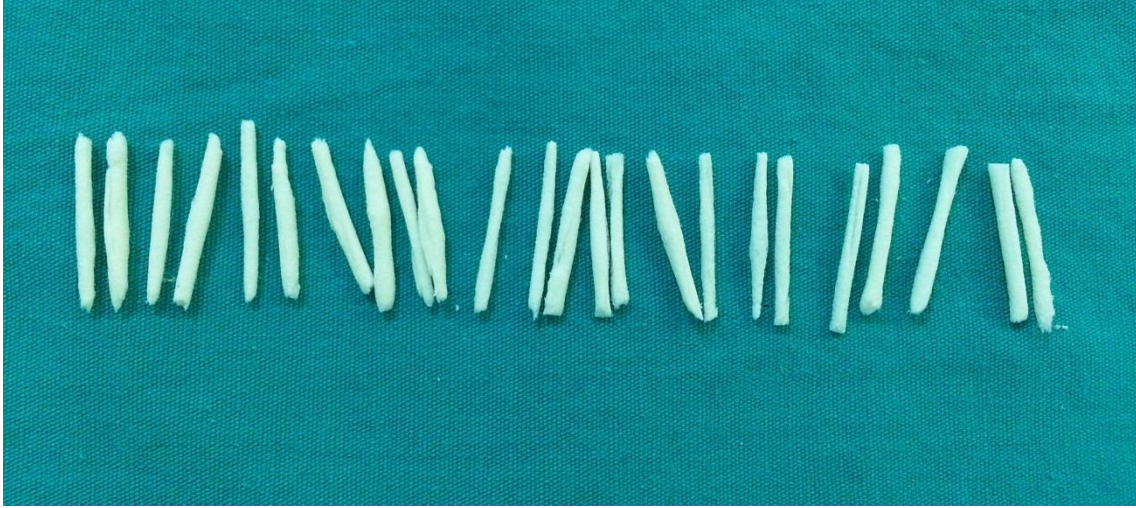
3.3. Deney Hayvanlarının Hazırlanması ve Deneysel İşlem

Tüm ratlarda, 60 mg/kg dozunda intraperitoneal ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı Parke-Davis, İstanbul, Türkiye) ve 6 mg/kg dozunda intraperitoneal Xylazine HCl (Alfazyne®, Alfasan International BV, Woerden, Hollanda) ile anestezi sağlandıktan sonra mikroskop altında kulak muayeneleri tamamlandı (Fotoğraf 1).



Fotoğraf 1. Rat dış kulak yolu muayenesi (kırmızı ok dış kulak yolu, siyah ok TM)

Ardından topikal uygulamada kullanılacak spongostanlar (SPONGOSTAN™ Standard, ETHICON™, Ref: MS0002) şerit şeklinde hazırlandı (Fotoğraf 2).



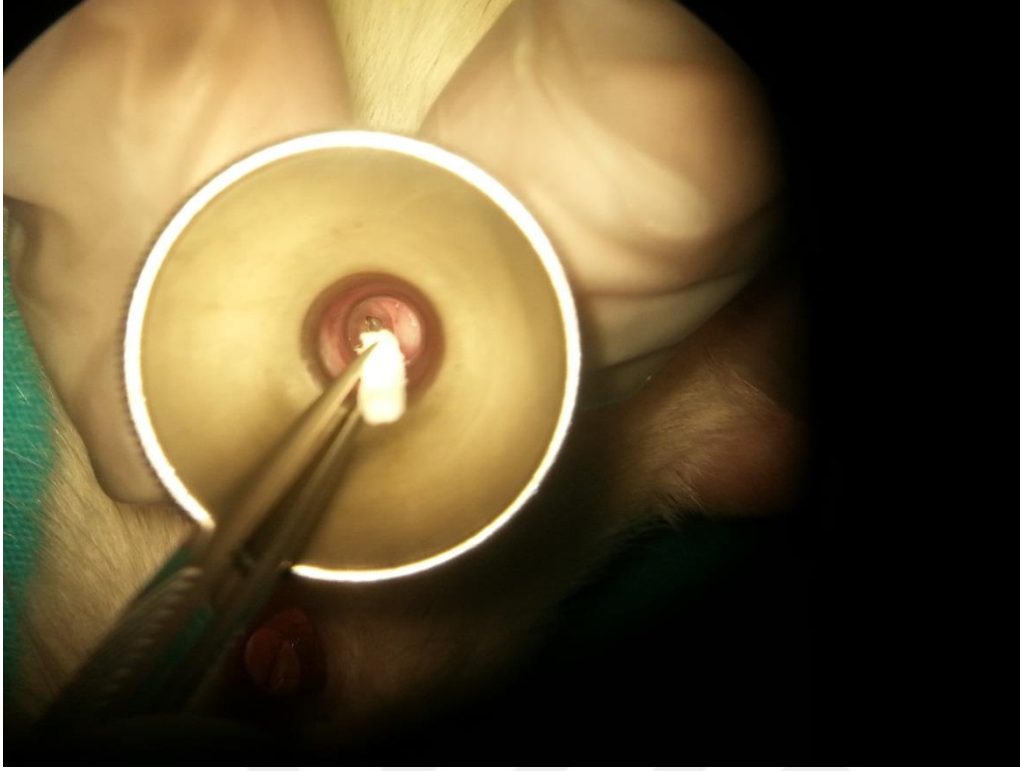
Fotoğraf 2. Şerit şeklinde hazırlanmış spongostanlar

Botulinum toksini (BOTOX® liyofilize toz içeren flakon 100 İÜ Allergan) (Fotoğraf 3) sulandırma işlemine geçildi. 100 İÜ botulinium toksini içeren flakon, 1,6 cc SF ile sulandırılarak 0,16 dzm'de 1 İÜ botulinium toksini elde edildi. Botoks 1 cc=10 dzm lik insülin enjektörüne çekildi.



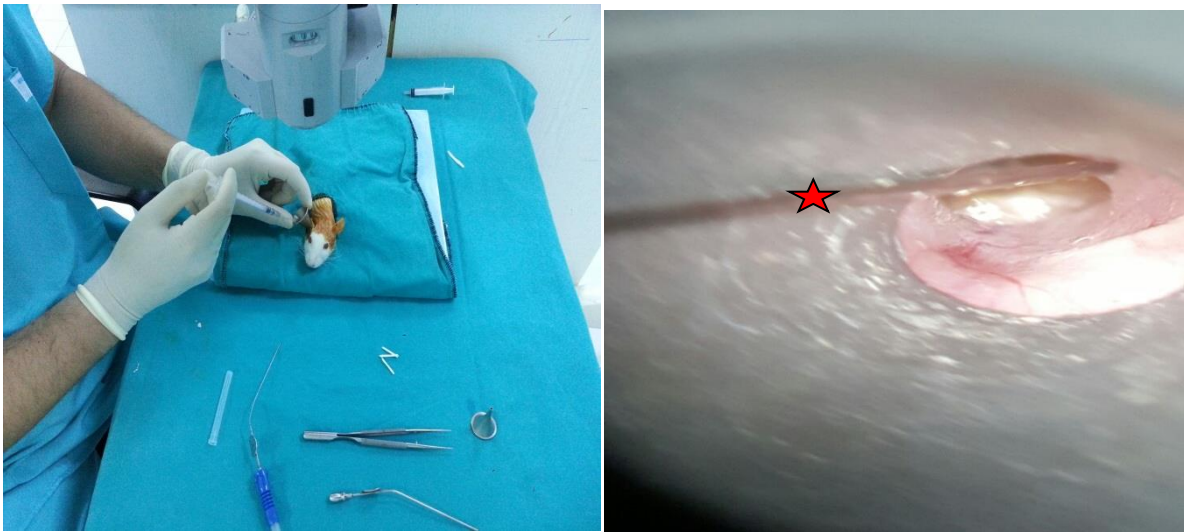
Fotoğraf 3. Botulinum toksin Tip A preparatı. Botox®

Topikal uygulama yapılacak grup I'deki hayvanlar işleme alındı. Grup I'deki 24 hayvanın sağ dış kulak yoluna şerit şeklinde hazırlanmış spongostanlar yerleştirildi ve hepsine 5 İÜ (0,8 dzm) botoks emdirildi (Fotoğraf 4). Grup I'deki hayvanlar 3 eşit gruba ayrıldı ve kafeslerine alındı.



Fotoğraf 4. Dış kulak yoluna botoks emdirilmiş spongostan yerleştiriliyor.

İntrakütanöz uygulama yapılacak grup II'deki hayvanlar işleme alındı. Grup II'deki 24 hayvanın sağ dış kulak yolu kıkırdak kısmı cildi içine, dental iğne ucu yardımıyla 2,5 İÜ (0,4 dzm) botoks enjeksiyonu yapıldı (Fotoğraf 5). Grup II'deki hayvanlar 3 eşit gruba ayrıldı ve kafeslerine alındı.



Fotoğraf 5. Dış kulak yoluna botoks enjeksiyonu yapılıyor (kırmızı yıldız enjektör).

İlk uygulamadan sonraki 10. günde grup Ia'daki 8 hayvan ve grup IIa'daki 8 hayvan sakrifiye edildi. İlk uygulamadan sonraki 30. günde de grup Ib'deki 8 hayvan ve grup IIb'deki 8 hayvan sakrifiye edildi. 30. günde grup Ic'deki 8 hayvana ve grup IIc'deki 8 hayvana ilk gün uygulanan işlem tekrarlandı. Grup Ic ve grup IIc'deki hayvanlar da 2. uygulamanın 10. gününde sakrifiye edildi.

Tüm uygulamalar hayvanların sağ kulaklarına yapıldı. Sol kulaklar, uygulama yapılmadan kontrol grubu olarak belirlendi.

Tüm hayvanlar sakrifikasyon sonrası dekapite edildi. Dekapitasyon sonrası her iki dış kulak yolu operasyon mikroskobu görüntüsü altında diseke edilerek ayrı ayrı spesimenler halinde histopatolojik incelemeye gönderildi.

3.4. Sakrifikasyon ve Diseksiyon

Tüm gruplar, kendi tedavi bitim zamanlarında 150 mg/kg dozunda intraperitoneal ketamin hidroklorür enjeksiyonu ile sakrifiye edilip dekapite edildi. Dekapitasyon işlemi sonrası formaldehit solüsyonu içerisinde 4 gün bekletildikten sonra operasyon mikroskobu görüntüsü altında mikrodiseksiyon yöntemiyle her iki kulağın dış kulak yolu, cilt ve ciltaltı dokusu ile çıkarıldı (Fotoğraf 6). Çıkarılan dış kulak yolu lateral kısmı işaretlenerek formaldehit solüsyonuna kondu ve histopatolojik incelemeye gönderildi.



Fotoğraf 6. Diseke edilmiş rat dış kulak yolu

3.5. Histopatolojik İnceleme

Sağ ve sol ayrı ayrı tasnif edilen dış kulak yolu epitel materyalleri Patoloji bölümüne teslim edildi.

Makroskopik olarak bir ucu işaretli yuvarlak oval ortada enjeksiyona bağlı skar içeren örnekler, skar alanını içerecek şekilde örneklendi. Enjeksiyon skarı içermeyen grup da benzer şekilde örneklendi. Tüm örnekler Hemotoksilen Eozin (H.E.), Periodik Asit Schiff (PAS), Diastazlı Periodik Asit Schiff (D-PAS), Müsin ve TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP Nick End Labeling) yöntemi ile Apog-tag antikoru (ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit: S7101 LOT: 2739121 Millipore) uygulandı. H.E. boyalı preparatlar ve tüm diğer boyalı örnekler eş zamanlı olarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. (Fotoğraf 7-13)

H.E. boyalı preparatlarda yüzeyde yer yer keratinizasyon içeren epitel, epitel altında sebase bez ve kıl köklerini içeren deri ekleri, inflamatuvar hücreler, damar yapıları, sinir kesitleri, kıkırdak doku ve tükürük bezi dokusu izlendi. Morfolojik olarak epitel değişiklikleri, inflamasyon, tükürük bezi ve deri eklerindeki morfolojik özellikler ve kalsifikasyon varlığı; PAS, D-PAS ve Müsin boyalı örnekler ile birlikte değerlendirildi.

3.5.1. Patolojik değişkenlikler

3.5.1.1. İnflamasyon

Tüm örneklerde epitel altında dağınık 10 büyük büyütme alanında izlenen lenfosit plazma hücrelerini içeren hücre popülasyonunun görülmesi inflamasyon varlığı olarak değerlendirildi. PAS, D-PAS ve Müsin ile bez yapıları ve tükürük bezi dokusundaki intrasitoplazmik boyanma değerlendirildi. İnflamasyon var ve yok olarak skorlandı. Kalsifikasyon varlığı, pozitif bulgu olarak dağılım ve yaygınlığı göz önüne alınmadan değerlendirildi.

3.5.1.2. Sekresyondaki değişiklikler

Tükürük bezi dokusunda serömüköz bez yapılarının sekresyonları PAS, D-PAS ve Müsin boyanma şiddetlerine göre değerlendirildi. Sekresyondaki değişiklik var ve yok olarak skorlandı.

3.5.1.3. Kalsifikasyon

Tüm örneklerde kalsifikasyon varlığı ve yaygınlığı değerlendirildi. Kalsifikasyon var ve yok olarak skorlandı.

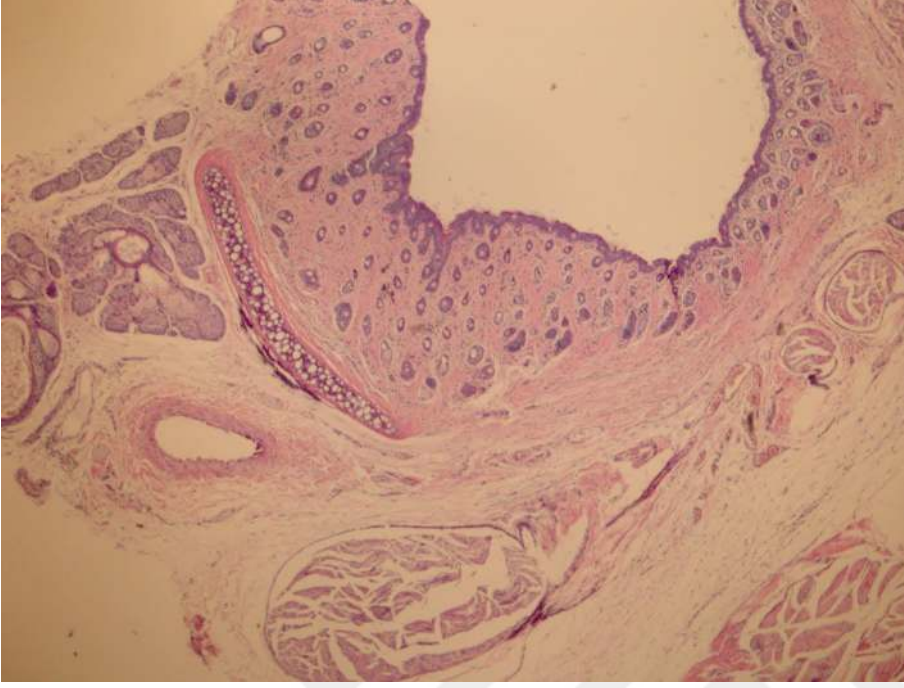
3.5.1.4. Apoptozis değerlendirilmesi

Apoptozis, APO2.7 antijenine karşı kullanılan antikorlarla tespit edildi. APO2.7 proteini mitokondrial membranda yerleşen ve apoptozisin erken fazlarında ortaya çıkan bir proteindir. Olgularda apoptozisin tespitinde parafin bloklara immünohistokimyasal yöntemle TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP Nick End Labeling) yöntemi ile ApopTag (ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit: S7101 LOT: 2739121 Millipore; Intergen, Purchase, NY, ABD) antikorı uygulandı. ApopTag boyanma skoru tükürük bezi dokusunda, epitelde ve epitel altı sebace bez yapılarında ayrı ayrı değerlendirildi. Boyanma paterni hücre çekirdeğini tamamen kaplayan ve koyu kahve renkte boyanan hücreler değerlendirildi, soluk ve açık renk boyanma değerlendirme dışı bırakıldı. Tükürük bezi boyanmasında; ışık mikroskobunda 10 büyük büyütme alanında seçilen en yoğun boyanan 3 farklı boyanma alanı, 20 büyük büyütme alanında değerlendirildi. 100 hücrede boyanan hücre sayısı sayılarak 3 alanın ortalaması alındı ve skor belirlendi. Epitel ve sebace bez yapılarında ise, izlenen hücre sayısı için tek bir alan değerlendirilerek skor belirlendi.

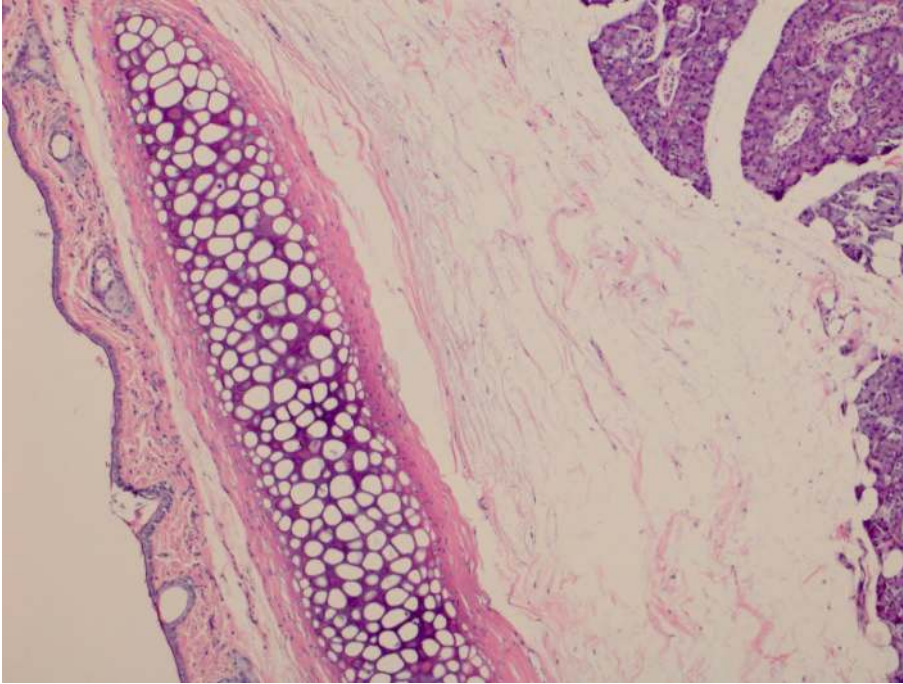
ApopTag antikorı dokulara TUNEL yöntemi ile uygulandı.

TUNEL yöntemi: Parafin bloklardan hazırlanan 5 mikron incelikteki kesitler deparafinize edilerek, azalan konsantrasyondaki alkol ile muamele edilip rehidrate edildi. Deparafinize dokular, örneklerin geçirgenliğini arttırmak için, taze hazırlanan proteinase K (20 µg/mL) solüsyonu ile oda sıcaklığında 15 dakika muamele edildi. Kesitler iki kez distile su ile yıkandıktan sonra, endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla, PBS solüsyonu içinde, 3% H₂O₂ ile 5 dakika inkübe edildi, ardından PBS ile 5 dakika süre ile yıkandı. Sonrasında hızlı bir şekilde 75 mikrolitre equilibration buffer uygulandı ve 30 dakika beklendi. Örnekler daha sonra TUNEL reaksiyon karışımına tabii tutuldu (Bu karışım 9-OH DNA bitiminin serbest nükleotidlerinin polimerizasyonunu şablon bağımsız olarak katalize etmektedir) ve DNA'nın kırılmış parçalarını işaretlemek için RT'de nemlendirme odasında 1 saat tutuldu. Daha sonra Converter-POD ile 30 dakika inkübe edildi, boyama için 12 dakika

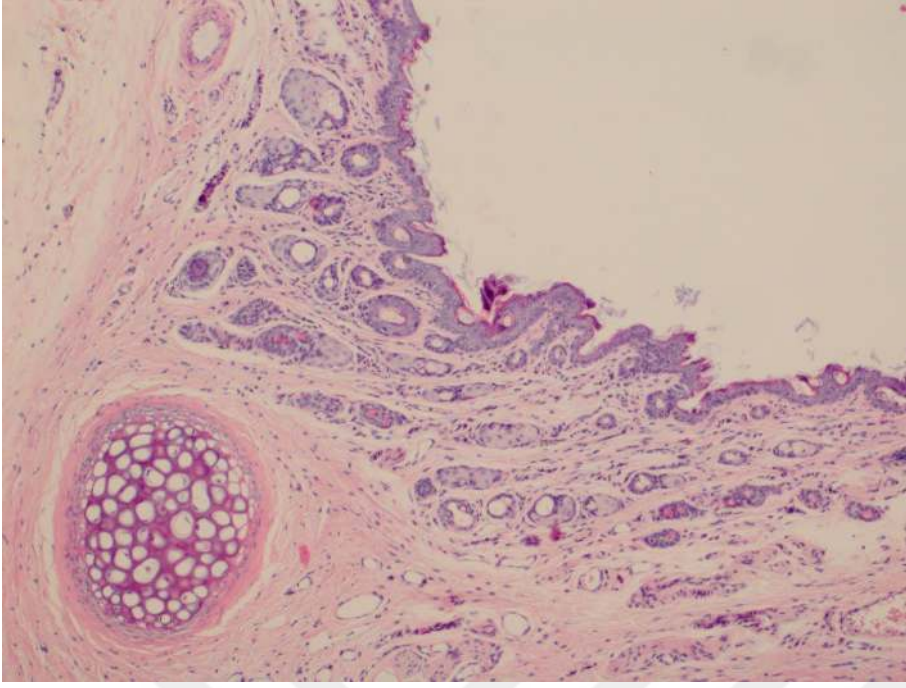
3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC) ile muamele edildi. Sonrasında metil yeşili ile ters boyama uygulandı. Uygulanan işlemler arasında preparatlar PBS ile yıkandı.



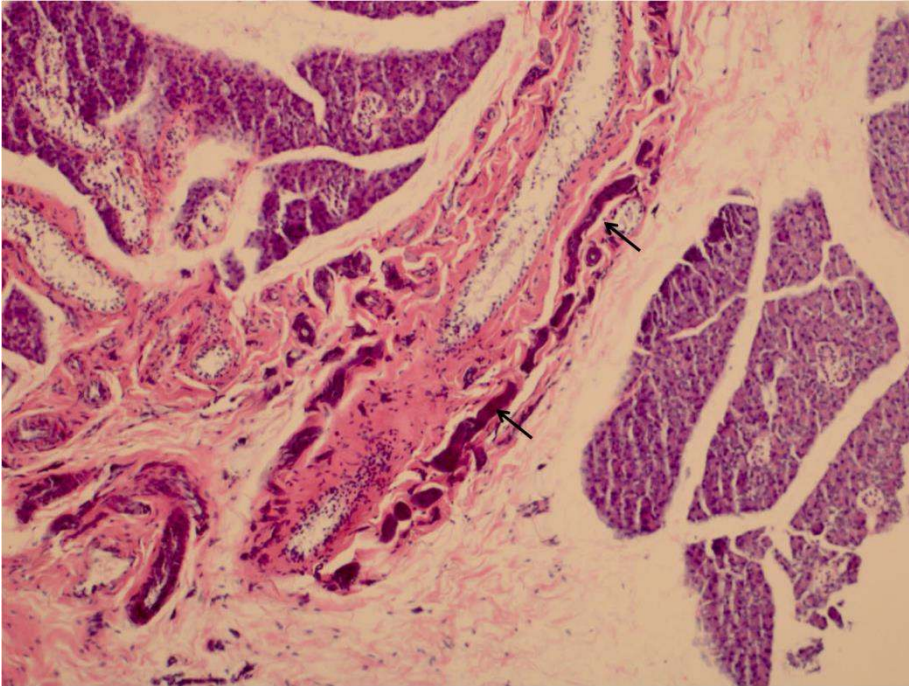
Fotoğraf 7. Epitel, deri ekleri, tükürük bezi dokusu içeren histolojik kesit. H.E.X100



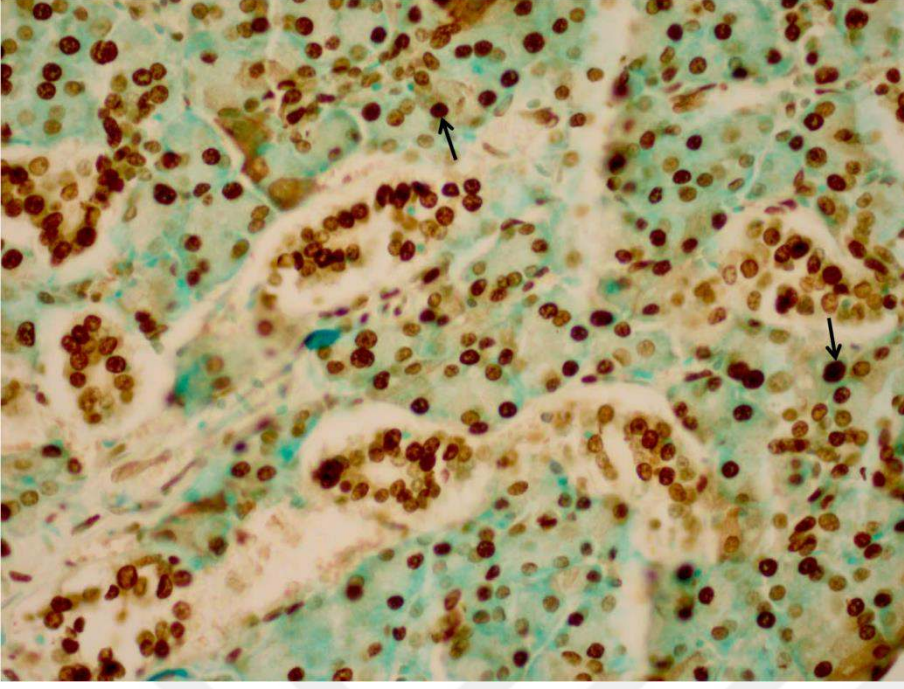
Fotoğraf 8. İnflamasyon içermeyen örnekler. H.E. X100



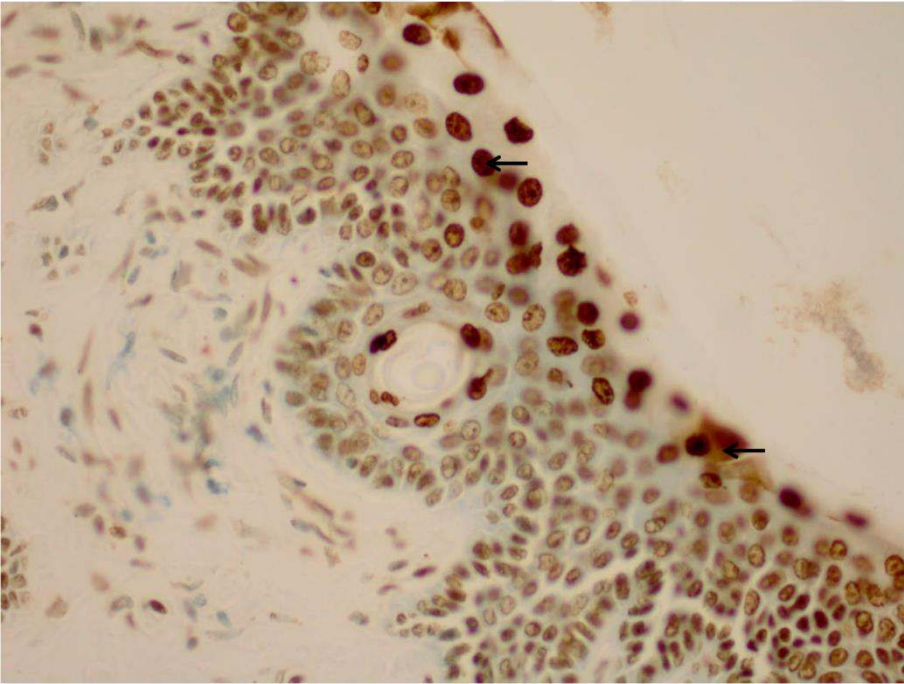
Fotoğraf 9. İnflamasyon içeren örnekler. H.E.X100



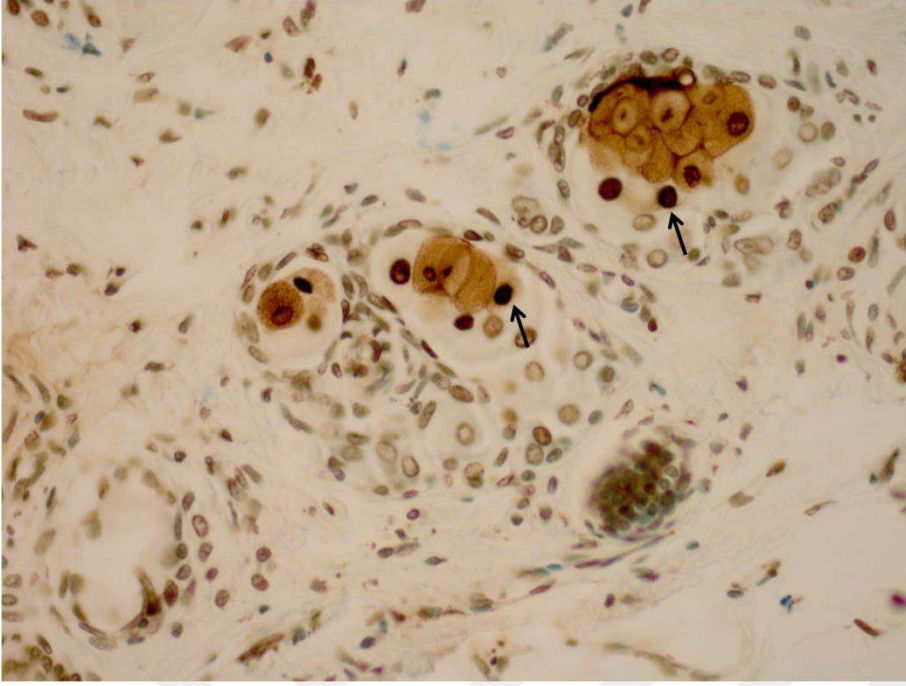
Fotoğraf 10. Tükürük bezi dokusu çevresinde kalsifikasyon odağı. (Oklar: Kalsifiye alanlar)
H.E.X100



Fotoğraf 11. Tükürük bezi asinilerinde ApopTag boyanması değerlendirilen hücreler. (Oklar: Apoptozise giren hücreler) X400



Fotoğraf 12. Epitel hücrelerinde ApopTag boyanması değerlendirilen hücreler. (Oklar: Apoptozise giren hücreler) X400



Fotoğraf 13. Sebase bez yapılarında ApopTag boyanması değerlendirilen hücreler. (Oklar: Apoptozise giren hücreler) X400

3.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 17.0 paket programı (SPSS Inc., Chicago, IL) kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum-maksimum) olarak özetlendi. Gruplar arasındaki sürekli ölçümlerin karşılaştırılmasında dağılımlar kontrol edildi, parametrik dağılım ön şartı sağlanmadığından Kruskal Wallis testi ve Mann Whitney U testi kullanıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında da Ki-Kare testi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi $p < 0.05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

Ratlar topikal ve intrakütanöz botulinum toksini uygulamasını rahat tolere etti. Kilo kaybı veya aşırı kilo alımı saptanmadı. Yiyecek ve su tüketiminde farklılık görülmedi. Çalışma 48 rat ile tamamlandı. Sakrifikasyon sonrası dekapitasyon işlemi yapıldı ve tüm ratların dış kulak yolu epiteli çıkarılarak histopatolojik incelemeye tabi tutuldu.

Histopatolojik incelemede bakılan patolojik değişkenliklerde; her iki grupta ve kontrol grubunda inflamasyona rastlanıldı. Fakat topikal olarak botulinum toksini uygulanan Grup I, intrakütanöz enjeksiyon ile botulinum toksini uygulanan Grup II ve kontrol grubu arasında inflamasyon yoğunluğu açısından istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı. Hiçbir hayvanda sekresyon miktarında değişiklik gözlenmedi. Grup I ve kontrol grubunda kalsifikasyon gözlenmezken, II. grupta 7 hayvanın dış kulak yolunda kalsifikasyona rastlandı. Kalsifikasyon varlığı açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptandı ($p=0,0001$). İstatistiksel anlamlı farklılık oluşturan grubun grup II olduğu gözlemlendi (Tablo 2).

Tablo 2. Patolojik Değişkenlikler

n(%)	I	II	K	p
İnflamasyon	12 (50)	8 (33.3)	17 (35,4)	0,412
Sekresyondaki değişiklikler	0	0	0	-
Kalsifikasyon	0	7 (29.2)	0	0,0001

Histopatolojik incelemede dış kulak yolu epiteli, salgı bezleri ve tükürük bezlerinde apoptozise gidiş süreci de ApopTag skorlaması ile incelendi. ApopTag tükürük bezi, epitel ve sebace bez skorlarının hepsinde, gruplar arasında istatistiksel anlamlı düzeyde farklılık saptandı (Tablo 3).

Tablo 3. ApopTag skorları

Ortanca (min-maks)	I	II	K	p
Tükürük bezi skoru	17 (8-18)	29 (17-46)	4 (2-7)	0,0001
Epitel skoru	9 (6-17)	12 (8-18)	3 (1-5)	0,0001
Sebace bez skoru	4 (2-7)	5 (2-9)	1 (1-4)	0,0001

Gruplar aralarında ikili karşılaştırıldı. Grup I ve kontrol grubu aralarında ikili karşılaştırıldığında; ApopTag tükürük bezi, epitel ve sebase bez skorlarının hepsi, grup I'de istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek saptandı (Tablo 4).

Tablo 4. Grup I ve Kontrol Grubu ApopTag Skorları Karşılaştırması

Ortanca (min-maks)	I	K	p
Tükürük bezi skoru	17 (8-18)	4 (2-7)	0,0001
Epitel skoru	9 (6-17)	3 (1-5)	0,0001
Sebase bez skoru	4 (2-7)	1 (1-4)	0,0001

Grup II ve kontrol grubu aralarında ikili karşılaştırıldığında; ApopTag tükürük bezi, epitel ve sebase bez skorlarının hepsi, grup II'de istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek saptandı (Tablo 5).

Tablo 5. Grup II ve Kontrol Grubu ApopTag Skorları Karşılaştırması

Ortanca (min-maks)	II	K	p
Tükürük bezi skoru	29 (17-46)	4 (2-7)	0,0001
Epitel skoru	12 (8-18)	3 (1-5)	0,0001
Sebase bez skoru	5 (2-9)	1 (1-4)	0,0001

Grup I ve grup II aralarında ikili karşılaştırıldığında; ApopTag tükürük bezi, epitel ve sebase bez skorlarının hepsi, grup II'de istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek saptandı (Tablo 6).

Tablo 6. Grup I ve II ApopTag Skorları Karşılaştırması

Ortanca (min-maks)	I	II	p
Tükürük bezi skoru	17 (8-18)	29 (17-46)	0,0001
Epitel skoru	9 (6-17)	12 (8-18)	0,001
Sebase bez skoru	4 (2-7)	5 (2-9)	0,009

Grup I'in alt gruplarında ApopTag skorları incelendiğinde ApopTag tükürük bezi skoru grup Ia'da 18 ile en yüksek bulunmuş olup grup Ib ve Ic'de 15 bulundu. İstatistiksel olarak grup Ia, Ib ve Ic arasında anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). ApopTag epitel

skorunda grup Ib'de 11 ile en yüksek skor elde edildi. Grup Ia ve Ic'de ise skor 8 idi. İstatistiksel olarak grup Ia, Ib ve Ic arasında anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). ApopTag sebace bez skorunda ise grup Ia'da 5 ile en yüksek skor elde edildi. Grup Ib ve Ic'de ise sırası ile skor 3 ve 4 idi. İstatistiksel olarak grup Ia, Ib ve Ic arasında anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0,05$) (Tablo 7).

Tablo 7. Grup I ApopTag Skorları

Ortanca (min-maks)	a	b	c	p
Tükürük bezi skoru	18 (12-28)	15 (12-19)	15 (8-24)	0,126
Epitel skoru	8 (7-11)	11 (6-17)	8 (7-11)	0,192
Sebace bez skoru	5 (3-7)	3 (2-5)	4 (3-6)	0,121

Grup II'nin alt gruplarında ApopTag skorları incelendiğinde ApopTag tükürük bezi skoru grup IIA'da en yüksek bulunmuş olup skor 31 idi. Grup IIB ve IIC'de sırası ile 28 ve 29 bulundu. İstatistiksel olarak grup IIA, IIB ve IIC arasında anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). ApopTag epitel skorunda grup IIC'de 16 ile en yüksek skor elde edildi. Grup IIA ve IIB'de ise skor sırası ile 11 ve 12 idi. İstatistiksel olarak grup IIA, IIB ve IIC arasında anlamlı farklılık gözlemlendi ($p=0,04$). ApopTag sebace bez skorunda ise grup IIB ve IIC'de skor 6 bulundu. Grup IIA'da ise skor 4 bulundu. İstatistiksel olarak grup IIA, IIB ve IIC arasında da anlamlı farklılık gözlemlendi ($p=0,006$) (Tablo 8).

Tablo 8. Grup II ApopTag skorları

Ortanca (min-maks)	a	b	c	p
Tükürük bezi skoru	31 (23-46)	28 (17-33)	29 (23-42)	0,437
Epitel skoru	11 (8-14)	12 (9-16)	16 (9-18)	0,04
Sebace bez skoru	4 (2-6)	6 (5-8)	6 (4-9)	0,006

Grup I ve II'yi kendi içlerinde ikili karşılaştırdığımızda ise grup I alt gruplarının ikili karşılaştırmalarında hiçbirinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Sadece grup II'de istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu.

Grup IIA ve IIB'nin ikili karşılaştırılmasında sadece ApopTag sebace bez skoru IIB'de IIA'ya göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla bulundu ($p=0,003$) (Tablo 9).

Tablo 9. Grup IIa ve IIb ApopTag Skorları Karşılaştırması

Ortanca (min-maks)	a	b	p
Tükürük bezi skoru	31 (23-46)	28 (17-33)	0,234
Epitel skoru	11 (8-14)	12 (9-16)	0,328
Sebase bez skoru	4 (2-6)	6 (5-8)	0,003

Grup IIa ve IIc'nin ikili karşılaştırılmasında ApopTag epitel ve sebase bez skorlarının her ikisi de, IIc de IIa'ya göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla bulundu (Tablo 10).

Tablo 10. Grup IIa ve IIc ApopTag Skorları Karşılaştırması

Ortanca (min-maks)	a	c	p
Tükürük bezi skoru	31 (23-46)	29 (23-42)	0,382
Epitel skoru	11 (8-14)	16 (9-18)	0,021
Sebase bez skoru	4 (2-6)	6 (4-9)	0,010

Grup IIb ve IIc'nin ikili karşılaştırılmasında ise ApopTag tükürük bezi, epitel ve sebase bez skorlarının üçünde de istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 11).

Tablo 11. Grup IIb ve IIc ApopTag Skorları Karşılaştırması

Ortanca (min-maks)	b	c	p
Tükürük bezi skoru	28 (17-33)	29 (23-42)	0,798
Epitel skoru	12 (9-16)	16 (9-18)	0,083
Sebase bez skoru	6 (5-8)	6 (4-9)	0,959

İstatistiksel olarak anlamlı olan bulgular özetlenecek olursa;

- Kalsifikasyon varlığı açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptandı ($p=0,0001$). İstatistiksel anlamlı farklılık oluşturan grubun grup II olduğu görüldü.
- ApopTag tükürük bezi ($p=0,0001$), epitel ($p=0,0001$) ve sebase bez ($p=0,0001$) skorlarının hepsinde, gruplar arasında istatistiksel anlamlı düzeyde farklılık saptandı.
- ApopTag tükürük bezi ($p=0,0001$), epitel ($p=0,0001$) ve sebase bez ($p=0,0001$) skorlarının hepsi, kontrol grubuna göre grup I'de istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek saptandı.

- ApopTag tükürük bezi ($p=0,0001$), epitel ($p=0,0001$) ve sebase bez ($p=0,0001$) skorlarının hepsi, kontrol grubuna göre grup II'de istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek saptandı.
- ApopTag tükürük bezi ($p=0,0001$), epitel ($p=0,001$) ve sebase bez ($p=0,009$) skorlarının hepsi, grup I'e göre grup II'de istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek saptandı.
- Grup II alt grupları arasında ApopTag epitel ($p=0,04$) ve sebase bez ($p=0,006$) skorları istatistiksel anlamlı düzeyde farklılık saptandı.
- ApopTag sebase bez skoru grup IIb'de IIa'ya göre istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek saptandı ($p=0,003$).
- ApopTag epitel ($p=0,021$) ve sebase bez ($p=0,01$) skorları grup IIc'de IIa'ya göre istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek saptandı.

5. TARTIŞMA

Günümüzde btx, çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Özellikle fokal distoniler (blefarospazm, servikal distoni, spazmodik disfoni vb), istemsiz hareketler (palatal miyoklonus, hemifasiyal spazm, tik, tremor), uygun olmayan kontraksiyonlar (strabismus, kekemelik, spastik mesane, akalazya) ve kozmetik (kırıksıklıklar, fasiyal asimetri) amaçlı kullanılmaktadır. Ayrıca vücut sıvılarının hipersekresyonunda, ter veya mukus salınımını azaltmada ve malign hastalıkların ülserlerinde de kullanılmaktadır.¹ Btx, hipersalivasyon tedavisi amacıyla submandibüler ve parotis bezlerine enjekte edilmekte, postoperatif tükürük fistüllerinde de kullanılmaktadır.³⁻⁷ Yine intrinsik veya allerjik rinit tedavisinde de kullanılmaktadır.⁸⁻¹⁰ Fakat yerli ve yabancı literatürde btx'un dış kulak yoluna uygulanımı ve etkisi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle btx'un salgı bezlerine etkisini dış kulak yolunda görmek ve aşırı serümen birikimini engelleyebilmek amaçlı bu çalışmayı yaptık. Çalışmamızda 48 adet ratın dış kulak yolu, uygulama sonrasında patolog tarafından incelenmiştir.

Kim ve ark.⁷⁰ Btx-A kullandıkları 43 hastada toksinin burun akıntısını belirgin bir şekilde azalttığını, fakat hapşırık ve burun tıkanıklığını etkilemediğini göstermişlerdir. Bunun nedeninin; vasküler muskarinik reseptörün atropine dirençli olması ve antikolinerjik ilaçların teropötik potansiyelinin, hipersekresyonu tedavi etmeye yönelik olması nedeniyle¹³⁶, kolinerjik blokajın burun tıkanıklığı veya hapşırığı iyileştirmekten ziyade sekresyonu azalttığı olduğunu belirtmişlerdir.

Rohrbach ve Laskawi⁷¹ Btx-A uyguladıkları tek bir hastada hem burun akıntısı hem de burun tıkanıklığında anlamlı azalma tespit etmişler. Bu durumun, daha önce ginea piglerin burunlarına botoks uygulaması sonucunda nazal glandlarında apoptozis gördükleri çalışmalarına¹³⁷ dayanarak, salgı bezlerindeki hacim azalmasına bağlı olarak gelişebileceğini düşünmüşlerdir.

Ünal ve ark.⁷² ise Btx-A'nın burun akıntısı, burun tıkanıklığı, hapşırık ve kaşıntıyı (etkisi 2 hafta süreli olsa da) anlamlı olarak azalttığını tespit etmişlerdir

Biz de çalışmamızda dış kulak yolundaki sekretuar hücrelerin salgı üretimini btx uygulanması ile engellemek ya da azaltmak istedik. Fakat btx uygulanımı sonrası hiçbir

hayvanda, kırk güne kadar olan süre içinde, dış kulak yolunda sekresyon değişikliği görmedik.

Rohrbach ve Laskawi⁷¹, yaptıkları çalışmada her bir nazal kaviteye 20 ünite olacak şekilde Btx-A emdirilmiş gazlı bez kullanmışlardır. Ünal ve ark.⁷² ise bir grup hastalarına her bir nazal kaviteye 20 ünite olacak şekilde toplam 40 ünite, diğer bir grup hastalarına ise her bir nazal kaviteye 30 ünite olacak şekilde toplam 60 ünite Btx-A enjekte etmişler, iki grup arasında semptomların düzelmesi bakımından anlamlı fark bulamamışlardır.

Biz de çalışmamızda gruplara ayırdığımız hayvanların bir kısmına tek doz 2.5 IU intrakütanöz Btx-A enjeksiyonu, bir kısmına 5 IU topikal Btx-A uygulaması yaptık. Bir kısmına ise birinci doz Btx-A uygulamasından 30 gün sonra ilk doz ile aynı miktarda ikinci doz Btx-A uygulaması yaptık. Fakat sekresyon açısından topikal ve enjeksiyon şeklinde uygulama yapılan gruplar arasında da, tek doz ve iki doz uygulama yapılan gruplar arasında da anlamlı farklılık bulamadık.

Coşkun ve ark.¹³⁸ ratlarda submandibüler glanda btx enjeksiyonu yaptığı çalışmasında lenfositik infiltrasyon haricinde hücresel değişiklik saptamamış, aynı zamanda apoptozis ile ilgili de herhangi bir değişiklik bildirmemişlerdir.

Bizim çalışmamızda ise topikal uygulama yapılan ratların %50'sinde (n:12), intrakütanöz enjeksiyon yapılan ratların %33.3'ünde (n:8), kontrol grubunun ise %35.4'ünde (n:17) inflamasyon (lenfosit infiltrasyonu) gözlemlendi. Fakat gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi. Apoptozis sürecinin ise tüm ratlarda başladığı görüldü. Tüm gruplar karşılaştırıldığında ApopTag skorlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlendi (Tablo 3). Kontrol grubuna göre, btx uygulanan her iki grupta da ApopTag skorları istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (Tablo 4,5). Enjeksiyon şeklinde btx uygulanan grup II ratlarda, topikal uygulama yapılan grup I ratlara göre ise apoptozisin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu görüldü (Tablo 6). Buradan yola çıkarak, btx'un dış kulak yolu epitel ve salgı bezlerinde apoptozisi artırdığı ve enjeksiyon yöntemi ile uygulamanın topikal uygulamaya göre apoptozisi artırmada daha etkili olduğu sonucuna ulaşıldı.

Hücre ölümünün morfolojik bir formu olan Apoptozis, ilk olarak Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972'de tanımlanmıştır. Programlanmış hücre ölümü olarak da isimlendirilir. Apoptozis; embriyonik gelişim, normal gelişim, normal hücre döngüsü, immün

sistem fonksiyonu, hormon bağımlı atrofi ve kimyasal olarak uyarılmış hücre ölümünü içeren çeşitli olayların hayati bileşenidir.¹³⁹ Bizim çalışmamızda görülen apoptozis, kimyasal olarak uyarılmış hücre ölümüne örnektir.

Çok az ya da çok fazla görülen apoptozis, iskemik zarar, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve birçok kanser tipinin gelişiminde bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Apoptozis iki şekilde karşımıza çıkabilir: Birincisi normal gelişim, yaşlanma ve dokulardaki hücrelerin devamlılığını sağlamak için bir homeostatik mekanizma olarak, ikincisi ise hastalık ya da zararlı ajanlar tarafından hücreler zarar gördüğünde ya da immün reaksiyonlarda savunma mekanizması olarak. Sağlıklı dokularda, dokunun genel fonksiyonları etkilenmedikçe hücrelerin hızlı bir şekilde yıkılmasına gerek yoktur. Bu aşamada hücreler programlanmış hücre ölümü yani apoptozis olarak isimlendirilen spontan ve aktif intiharlar üstlenir. Apoptozis; nekrozdan farklı olarak bir hücrenin aktif bir şekilde belirli uyarınları alması ile ölüme doğru izlediği yolu gösterir. Hücrenin apoptoza mı nekroza mı gideceği, uyarının tipi ve/veya derecesi ile belirlenir. Radyasyon, hipoksi, sıcaklık ve sitotoksik ilaçlar gibi zararlı uyarınlara, düşük dozlarda apoptozise, yüksek dozlarda ise nekroze neden olabilir. Bu süreç belirli basamaklardan oluşur.¹³⁹ Bizim çalışmamızda dış kulak yolu epitel ve sebace bezlerinde apoptozis süreci başlamış, fakat sebace bezlerde apoptozis görülmesine rağmen sekresyon miktarında değişiklik görülmemiştir. Apoptozisin, henüz sekresyon miktarını değiştirebilecek kadar hücre ölümü yapmamış olması nedeniyle apoptozise rağmen sekresyon miktarının azalmadığı görüldü. Bu nedenle botoks uygulanması sonrası geçen sürenin uzatılması, uygulanan botoks dozunun artırılması ve/veya tekrarlayan dozların uygulanması ile apoptozis miktarının ve hızının artırılabilmesi, bu sayede de sekresyon miktarında azalma olabileceği düşünülmüştür.

Rohrbach ve ark.¹³⁷ yaptığı çalışmada guinea piglerin submandibüler glandına btx enjeksiyonu sonucu glandda apoptozis gözlemiş ve glandüler atrofi geliştiğini görmüşlerdir. Yine Doggweiler ve ark.¹⁴⁰ ratlarda yaptığı çalışmada prostat bezine btx enjeksiyonu sonucu diffüz glandüler apoptozis ve generalize atrofi bildirmişlerdir. Aynı şekilde Ellies ve ark.¹⁴¹ ratların parotid glandına yaptıkları btx enjeksiyonu sonucunda glanddaki asiner hücre çekirdek sayısında ve hücre hacminde azalma tespit etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da bunlara benzer şekilde btx uygulaması sonucunda tüm ratların dış kulak yolunda bulunan tükürük bezi ve sebace glandlarda apoptozis sürecinin başladığı görüldü. Kontrol grubuna göre btx uygulaması yapılan her iki grupta da apoptozisin

istatistiksel anlamlı düzeyde fazla görülmesinin yanında, intrakütanöz enjeksiyon yapılan grupta topikal uygulama yapılan gruba göre, özellikle tükürük bezlerinde olmak üzere, hem tükürük bezlerinde hem de sebase bezlerde apoptozisin anlamlı düzeyde fazla olduğu görüldü.

Btx uygulamasında lokal ve sistemik yan etkiler görülebilir. Lokal olarak uygulama yapılan bölgede ödem, ekimoz, ağrı, kanama, enfeksiyon, deride pullanma ve dökülme görülebilir. Ayrıca uygulanan kaslarda güçsüzlük ve zayıflık, asimetrik görünüm de görülebilir. Yanlışlıkla damar içine verildiği durumlarda genel bir halsizlik, yorgunluk, grip benzeri bulgular ortaya çıkabilir. Fakat bu sistemik yan etkiler oldukça nadir görülmektedir. Bizim çalışmamızda da hiçbir hayvanda lokal ve sistemik yan etki görülmemiştir.

Bu çalışmada patolojik değişkenlikler değerlendirildiğinde, inflamasyon açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık görülmemesi ve btx uygulaması yapılan her iki grupta da inflamasyonun %50 ve altında görülmesi, bu deneysel çalışmanın insanda uygulanabilirliği açısından olumlu bir sonuç olarak değerlendirildi. Patolojik değişkenliklerden sekresyonda değişiklik olmamasının nedeninin ise, uygulanan btx dozu ve uygulama sonrası geçen süre ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bundan dolayı uygulanan botulinum toksini dozunun artırılması, tekrarlayan dozlarda uygulanımı ve uygulama sonrası geçen sürenin uzatılması daha olumlu sonuçlar verebilir. Kalsifikasyon, kontrol grubunda ve topikal uygulamada görülmemiş fakat intrakütanöz enjeksiyonla uygulamada %29.2 (n:7) oranında, istatistiksel olarak da kontrol grubu ve topikal uygulanan gruba göre anlamlı düzeyde fazla görülmüştür ($p=0,0001$). Kalsifikasyon, istemediğimiz bir patolojik değişkenlik olması nedeniyle, bu sonuçlar uygulama şekli olarak topikal uygulamayı seçmeye bizi yönlendirmektedir.

Tüm hayvanların dokularının apoptozise gidişi değerlendirildiğinde ise, dış kulak yolunda salgı yapan tükürük bezi, sebase bezler ve epitelde apoptozis gözlemlendi. Apoptozis görülmesi, salgı yapan yapıların atrofiye gidişi ve dolayısı ile dış kulak yolunda salgıların azalması ile sonuçlanacağı için olumlu bir sonuç olarak değerlendirildi. Dış kulak yolundaki bu salgı yapan yapıların apoptozise gidişi gruplar arasında karşılaştırıldığında hepsinde grup II'de grup I'e göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış apoptozis olduğu görüldü (Tablo 6). Bu sonuca göre; dış kulak yolu epiteli ve salgı bezlerinde ortaya çıkacak patolojik değişkenlikler yönünden enjeksiyonla uygulama yapılmasının topikal uygulamaya göre daha etkili olduğu görüldü.

Apoptozis, grup I alt grupları arasında değerlendirildiğinde salgı yapan 3 yapıda da apoptozis görüldüğü, fakat aralarında karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı

farklılık olmadığı gözlemlendi. Bu da bize topikal uygulamada, uygulamanın üzerinden geçen sürenin ve ikinci doz uygulamasının apoptozise gidişe katkı sağlamadığını gösterdi (Tablo 7).

Apoptozis, grup II alt grupları arasında değerlendirildiğinde ise yine salgı yapan 3 yapıda da apoptozis görüldüğü, grup I'e göre daha fazla miktarda apoptozis görüldüğü ve aralarında karşılaştırıldıklarında epitel ve sebace bezlerde görülen apoptozislerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık olduğu görüldü. Fakat tükürük bezlerinde görülen apoptozislerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi. Bu sonuç bize intrakütanöz enjeksiyon uygulamasında, uygulamanın üzerinden geçen sürenin ve ikinci doz uygulamasının apoptozise gidiş sürecine katkı sağlayabileceğini gösterdi (Tablo 8).

Grup II'de ApopTag skorlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülmesi üzerine alt gruplar kendi aralarında ikili karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmalar sonucunda grup IIa ve IIb arasında sadece sebace bezlerde apoptozise gidişte grup IIb lehine istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü (Tablo 9). Bu sonuç bize uygulama sonrası geçen sürenin apoptozisi artırdığını gösterdi. Birinci dozdan 30 gün sonra ikinci doz yapmamızın nedeni ise; literatürde çalışmamıza benzer bir çalışma olmaması, btx uygulanan diğer deneysel hayvan çalışmalarında^{138,140} btx uygulanması sonrası 1. ayda etkinin kontrol edilmesidir. Bu nedenle 1. ayda btx etkisini değerlendirip tekrarlayan doz etkisini görmek açısından 2. doz uygulamayı yaptık. Btx etkisini 10. günde ve 1. ayda değerlendirmemizdeki bir diğer neden ise; btx etkisinin sonlanmasının dış kulak yolu epitelindeki süresinin bilinmemesidir. Btx etkisinin bitmesinin değerlendirilmesi, uygulama sonrası 1., 2., 3. ay gibi farklı sürelerde değerlendirilen hayvanların olduğu ileri deneysel çalışmalarla desteklenmelidir. Grup IIa ve IIc karşılaştırıldığında hem epitelde hem de sebace bezlerde apoptozise gidiş, grup IIc'de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla idi (Tablo 10). Bu da bize uygulama sonrası geçen sürenin yanında ikinci doz uygulamasının da apoptozisi artırdığını gösterdi. Bundan dolayı ikinci doz uygulandıktan sonra geçen sürenin daha uzun tutulması ve kontrolünün 10. günde değil de 30. günde yapılması, btx etkinliğinin daha fazla görülmesini sağlayabilir. Grup IIb ve IIc karşılaştırıldığında ise ApopTag skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı görüldü (Tablo 11). Bu sonuç ise ikinci doz uygulamasından ziyade uygulama sonrası geçen sürenin apoptozisi başlatma yönünden daha değerli olduğunu göstermektedir. Bu nedenle hem ikinci dozun yapılması hem de uygulama sonrası beklenen sürenin uzatılması ile daha olumlu sonuçların elde edileceği düşünülmüştür.

6. SONUÇLAR

1- Bu çalışma botulinum toksininin ratların dış kulak yolu epiteli ve salgı bezlerinde inflamasyon, kalsifikasyon ve apoptozise yol açtığını; ancak çalışmanın yapıldığı süre içerisinde sekresyon miktarında ise değişikliğe neden olmadığını göstermiştir.

2- Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında iki grupta da inflamasyon oranlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir. Fakat kalsifikasyon sadece enjeksiyonla botoks yapılan grup II'de görüldü ve hem kontrol grubu hem de grup I'e göre istatistiksel anlamlı fazla bulunmuştur.

3- Tüm gruplar arasında apoptozis skorlarında istatistiksel anlamlı farklılıklar görülmüştür. Botoks uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre apoptozis istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Enjeksiyonla botoks uygulanan grup II'de tüm ApopTag skorları, topikal botoks uygulanan grup I'e göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur.

4- Teorik olarak botulinum toksininin epitel ve salgı bezlerinde apoptozise yol açması ile salgıları azaltması ve dış kulak yolunda serümen miktarını düşürmesi beklenebilir. Fakat bu çalışmada sekresyon miktarında değişiklik olmamasının doz ve süre ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bundan dolayı uygulanan botulinum toksini dozunun artırılması, tekrarlayan dozlarda uygulanması ve uygulama sonrası geçen sürenin uzatılması daha olumlu sonuçlar verebilir.

5- Bu çalışmanın, dış kulak yolu epiteline botulinum toksini uygulaması için ilk deneysel çalışma olması nedeniyle ileri deneysel ve klinik çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Moore P, Naumann M. Handbook of Botulinum Toxin Treatment. 2nd ed. Blackwell Science Ltd.USA 2003; 3-76, 343-59.
2. Scott AB: Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *Ophthalmol* 1980, 87(10):1044-1049.
3. Shan X-F, Xu H, Cai Z-G, Wu L-L, Yu G-Y. Botulinum toxin A inhibits salivary secretion of rabbit submandibular gland. *International Journal of Oral Science* (2013) 5, 217–223
4. Morovic CG, Florin C, Searle S, Vidal C. Salival Fistulae: A Rare Complication After Microtic Ear Reconstruction. *The Journal of Craniofacial Surgery* 2011; Volume 22, Number 2; 726-27
5. Coskun BU, Savk H, Cicek ED, Basak T, Basak M, Dadas B. Histopathological and radiological investigations of the influence of botulinum toxin on the submandibular gland of the rat. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2007) 264:783–787
6. Blake KD, MacCuspie J, Corsten G. 2012. Botulinum toxin injections into salivary glands to decrease oral secretions inCHARGE syndrome: Prospective case study. *Am J Med Genet Part A* 158A:828–831
7. Rohrbach S, Laskawi R. Botulinum- Toxin inder Hals- Nasen-Ohrenheilkunde. *Laryngo-Rhino-Otol* 2003;82:202-18.
8. Laskawi R. The use of botulinum toxin in head and face medicine: An interdisciplinary field. *Head & Face Medicine* 2008, 4:5
9. Rohrbach S, Junghans K, Köhler S, Laskawi R. Minimally invasive application of botulinum toxin A in patients with idiopathic rhinitis. *Head & Face Medicine* 2009, 5:18
10. Ozcan C, Vayisoglu Y, Doğu O, Gorur K. The effect of intranasal injection of botulinum toxin A on the symptoms of vasomotor rhinitis. *American Journal of Otolaryngology–Head and Neck Medicine and Surgery* 27 (2006) 314– 318
11. Gulya A. Development of anatomy of the temporal bone and Skull Base. Shambaugh GE Jr, Glasscock ME III, editors. *Surgery of the ear*. ed 5. Philadelphia: WB Saunders; 2003:3-35.
12. Pearson A. Devolopment of anatomy of the ear In: English GM (editor) *Otolaryngology* Philadelphia: Harper and Row Publishers 1984:1-68.
13. <http://teachmeanatomy.info/head/osteology/temporal-bone/>

- 14.** Blaney SP, Tierney P, Oyarazabal M, Bowdler DA. CT scanning in “second look” combined approach tympanoplasty. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 2000;121:79-81.
- 15.** Wake M, Robinson JM, Witcombe JB, Bazerbach S, Stansbie JM, Phelps PD. Detection of recurrent cholesteatoma by computerized tomography after "closed cavity" mastoid surgery. *J Laryngol Otol* 1992; 106:393-395.
- 16.** Plouin-Gaudon I, Bossard D, Fuchsmann C, Ayari-Khalfallah S, Froehlich P. Diffusion-weighted MR imaging for evaluation of pediatric recurrent cholesteatomas. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010; 74:22-6.
- 17.** Meltzer PE. The mastoid cells: Their arrangement in relation to the sigmoid portion of the transvers sinüs. *Arch Otolaryngol* 1934;19:327-335.
- 18.** Aslan A, Kobayashi T, Diop D, Balyan FR, Russo A, Taibah A. Anatomical relationship between position of the sigmoid sinüs and regional mastoid pneumatization. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1996;253:450-453.
- 19.** Aslan A, Falcioni M, Balyan FR, De Donato G, Taibah A, Russo A, Sanna M. The cochlear aqueduct: An important landmark in lateral skull base surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;118:532-536.
- 20.** Aslan A, Göktan C, Okumuğ M, Tarhan S, Ünlü H. Morphometric analysis of anatomical relationships of the facial nerve for mastoid surgery. *J Laryngol Otol* 2001;115:447-449.
- 21.** Esraghi AA, Buchman CA, Telischi FF. Sensory auricular branch of the facial nerve. *Otol Neurotol* 2002;23:393-396.
- 22.** Akçam T, Yetişer S. Kafa tabanı, temporal kemik, dış kulak ve orta kulak anatomisi. Ed: Koç C. *Cummings Otolaringoloji Baş Boyun Cerrahisi*, Ed 4, Vol 4, Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2007: 2801-2814
- 23.** Leblanc A. Atlas of hearing and balance organs. A practical guide for otolaryngologists. Springer, Paris 1999.
- 24.** Saito H, Ruby RR, Schuknecht HF. Course of the sensory component of the nervus intermedius in the temporal bone. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1970;79:960-966.
- 25.** Reissner C, Schuknecht HF. The anterior inferior cerebellar artery in the internal auditory canal. *Laryngoscope* 1991;101:761-766.

- 26.** Silverstein H, Norrel H, Smouha E, Haberkamp T. The singular canal: A valuable landmark in surgery of the internal auditory canal. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1988;98:138-143.
- 27.** Tekdemir Ğ, Tüccar E, Aslan A, Elhan A, Deda H, Çiftçi E, Akyar S. The juguler foramen: a comparative radioanatomic study. *Surg Neurol* 1988;50:557-562.
- 28.** Tekdemir Ğ, Tüccar E, Aslan A, Elhan A, Ersoy M, Deda H. Comprehensive microsurgical anatomy of the juguler foramen and review of terminology. *J Clin Neurosci* 2001;8:351-356.
- 29.** Duckert LG. Anatomy of the skull base, temporal bone, external ear and middle ear. Complications of temporal bone infection. In: Cummings CW, Fredericson JM, Harker LA Krause CJ, Richardson MA, Schuller DE, editors: *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 3th ed, vol 4, St Louis,1998, Mosby
- 30.** Sanna M. The Temporal Bone: A Manual for Dissection and Surgical Approaches. Georg Thieme Verlag, 2006: 3-21.
- 31.** Tekdemir Ğ, Aslan A, Elhan A. A clinico-anatomic study of auricular branch of the vagus nerve and Arnold"s ear-cough reflex. *Surg Radiol Anat* 1998;20:253-257.
- 32.** <http://www.medillsb.com/ArtistPortfolioLarge.aspx?AID=5949&IID=122575>
- 33.** Katsuta T, Rhoton AL Jr., Matsushima T. The juguler foramen:microsurgical anatomy and operative approaches, *Neurosurgery* 41:149-202,1997.
- 34.** Donaldson JA, Duckert LG. Anatomy of the ears. In: Paparella MM, Shumrick DA, Gluckman JL, Meyerhoff WL (Eds.). *Otolaryngology Vol.1*, 3th ed. Philadelphia: WB Saunders Co.; 1991. p.23-58.
- 35.** Karasalihoğlu AR. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi. 3.Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2003. s.3-14.
- 36.** <http://www.geocities.ws/reunal/anatomi33.JPG>
- 37.** Akyıldız AN. Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi. Cilt 1, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 1998. s.1-71,77-102,143-97.
- 38.** John HM, Waren YA. Anatomy and physiology of hearing. In: Bailey BJ (Ed.). *Otolaryngol Head Neck Surgery. Vol.2*, Philedelphia: JB Lippincott Co.; 1993. p.1441-61.

- 39.** Cockayne S. Electrolytes. In: Saunders WB, Anderson SC (Eds.). Clinical Chemistry Concepts and Applications. 16th ed. Philadelphia: WB Saunders Co.; 1993. p.385-405.
- 40.** Ömür M, Dadaş B. Klinik Baş ve Boyun Anatomisi. Cilt 1, İstanbul: Ulusal Tıp Kitabevi; 1996. s.181-213.
- 41.** Lee KJ. Essential Otolaryngology and Head and Neck Surgery. 8th ed. Newyork: Medical Publish Co.; 2003. p.1-24.
- 42.** Kuran O. Sistemik Anatomi. İstanbul: Filiz Kitabevi; 1983. s.759-88.
- 43.** Austin FA. Anatomy of the ear. In: Ballenger JJ, Snow JB (Eds.). Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery. 15th ed. Philadelphia: Williams and Wilkins Co.; 1996. p.838-57.
- 44.** Lim DJ. Human tympanic membrane. An ultrastructural observation. Acta Otolaryngol 1970;70:176-186.
- 45.** Janfaza P, Nadol JB. Temporal kemik. In Janfaza P, Nadol JB, Gala R et al. (eds) (Çeviri: E. Güçlü, S. Bozan): Bas Boyun Cerrahi Anatomisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2002
- 46.** Aslan A, Belgin E. Kulak Anatomisi ve İşitme Fizyolojisi. In Koç C (ed) Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi 2004; 45-71.
- 47.** Austin DF. Anatomy of The Ear. In: Ballenger J. Diseases of the Nose, Throat, Ear, Head and Neck. 14th ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1991:922-947.
- 48.** Wright A. Anatomy and ultrastructure of the human ear. In: Keer AG, Gleeson M (Eds.). Scott-Brown's Otolaryngology. Vol.1, 6th ed. London: Butterworth-Heinemann Publish.; 1997; ch 1,1-50.
- 49.** http://www.slideshare.net/dr_razal/anatomy-of-middle-ear-54308120
- 50.** Shambaugh GE. Surgical Anatomy Of The Temporal Bone, Surgery Of The Ear. Philadelphia:W.B. Saunders Co., 1967:41-69.
- 51.** Schuknecht HF, Gulya AJ. Anatomy Of Temporal Bone With Surgical Implications. London: Leaand Febieger, 1986:301-309.
- 52.** Anson BJ, Donaltson AJ. Surgical Anatomy of Temporal Bone and Ear. Philadelphia: W.B.Saunders Co., 1973:105-137.
- 53.** <https://tr.pinterest.com/pin/370632244310060482/>
- 54.** Çakır N. Otolaringoloji baş ve boyun cerrahisi. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 1999. s.18-37,68-72.
- 55.** Bluestone CD, Cantekin E. Current clinical methods, indications and interpretation of eustachian tube function tests. Ann Otol Rhinol Laryngol 1981;90(6 Pt 1):552-62.

56. Takagi A, Sando I, Takahashi H. Computer-aided three-dimensional reconstruction and measurement of semicircular canals and their cristae in man. *Acta Otolaryngol*(Stockh) 1989;107:362-365.
57. Göksu N ve ark. Anatomy of the Guinea Pig Temporal Bone. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1992; 101: 699-704
58. Judkins RF, Li H. Surgical anatomy of the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 117: 438–47.
59. Daniel HJ, Fulghum RS, Brinn JE, Barrett KA. Comparative anatomy of eustachian tube and middle ear cavity in animal models for otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1982; 91: 82–89.
60. Albiin N, Hell tröm S, Stenfor L-E, Cerne A. Middle ear mucosa in rats and humans. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1986; 126 (Suppl): 2–15.
61. Hell tröm S, Salen B, Stenfor LE. Anatomy of the rat middle ear. A study under the dissection microscope. *Acta Anat.* 1982; 112: 346–52.
62. Heffner HE, Heffner RS. Hearing ranges of laboratory animals. *J Am Assoc Lab. Anim Sci.* 2007 Jan;46(1):20-2. Review. PubMed PMID: 17203911.
63. Carruthers A. Botulinum Toxin Type A: History And Current Cosmetic Use In The Upper Face. *Dis. Mon.* 2002;48(5):299-322
64. Van Ermengem E. Ueber einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* 1897;26:1-56 (translation reprinted in *Rev Infect Dis* 1979;1:701-719).
65. Scott AB. Foreword. In: Jankovic J, Hallett M, eds. *Therapy With Botulinum Toxin*. New York: Marcel Dekker, 1994: vii-ix.
66. BOTOX (Botulinum toxin type A) purified neurotoxin complex. Package insert, 1995.
67. Gartlan MG, Hoffman HT. Crystalline preparation of botulinum toxin type A (Botox): Degradation in potency with storage. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;108:135-40.
68. American Academy of Otolaryngology—Head & Neck Surgery. Policy statement: Botulinum toxin. Revised April 9, 1997; reaffirmed March 1998:1.
69. Shaari CM, Sanders I, Wu BL, Biler HF. Rhinorrhea is decreased in dogs after nasal application of botulinum toxin. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 112(4):566-71.
70. Kim KS, Kim SS, Yoon JH, et al. The effect of botulinum toxin type A injection for intrinsic rhinitis. *J laryngol Otol* 1998;112:248-51.
71. Rohrbach S, Laskawi R. Minimally invasive application of botulinum toxin type A in nasal hypersecretion. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2001;63:382- 84.

72. Ünal M, Sevim S, Doğu O, et al. Effect of Botulinum Toxin Type A on Nasal Symptoms in Patients with Allergic Rhinitis: A Double- Blind, Placebo- controlled Clinical Trial. *Acta Otolaryngol* 2003;123:1060-63.
73. Shelosky, L. History of the clinical use of Botulinum toxin type A. In Sommer, B. Sattler, G. (Eds.), *Botulinum Toxin in Aesthetic Medicine*. 1st edition. Berlin-Vienna: Blackwell Science, 2001; 1-7.
74. Kane, MAC. Botulinum Toxin. In: Aston SJ, Beasley RW, Thorne CH, Sixth Edition. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. Philadelphia: Lippincott Williams- Wilkins, 2007; 475-9.
75. Levinson, W. Temel Bakteriyoloji. In: Levinson W, Jawetz E, 5. Baskı. *Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji*. Barış kitabevi, 1999; 34,97.
76. Baumann L, Black L. Botulinum toxin type B (Myobloc). *Dermatol Surg* 2003; 29: 496-500.
77. Dutton JJ, Fowler AM. Botulinum toxin in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 2007; 52: 13-31.
78. Davletov B, Bajohrs M, Binz T. Beyond BOTOX: Advantages and Limitations of Individual Botulinum Neurotoxin. *Trends Neurosci*. 2005; 28: 446-52.
79. Kirazlı Y, Çeliker R, Elibol B ve ark. Spastisite Konsensus Bildirisi. *Romatol. Tıp Rehab*. 2004; 15: 137-47.
80. Brin MF. Botulinum toxin; chemistry, pharmacology, toxicity, and immunology. *Muscle Nerve* 1997;Suppl6:8146-168.
81. Esra Çelik Soylu, Doktora tezi, Pediküllü kas fleplerinin stabilizasyonunda Botulinum Toksin-A'nın kullanılması. T.C.Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniği İstanbul 2005.
82. Huang, W, Foster, J.A., Rogachefsky, A.S. Pharmacology of botulinum toxin. *J. Am. Acad. Dermatol*. 2000; 43: 249-59.
83. Pellizzari R, Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C. Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. *Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999;354:259-268.
84. <http://slideplayer.biz.tr/slide/2022819/>
85. <http://www.acikbilim.com/2013/12/dosyalar/konserveden-kirisiklara-botox.html>

- 86.** Brin MF. Botulinum toxin therapy: basic science and overview of other therapeutic applications. In: Blitzer A, Binder WJ, Boyd JB, Carruthers A, eds. Management of Facial Lines and Wrinkles. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:279-302.
- 87.** Karatepe AG. Spastisite Tedavisi. Ege Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi. 2004; 10: 93-102.
- 88.** Anthony HV, Schapira MD. Synaptic Transmission. In: Anthony H.V., Schapira, MD, DSc, FRCP, FMed Sci, eds. Neurology and Clinical Neuroscience, Philadelphia: Elsevier Inc. 2007; 108-16.
- 89.** Dressler D, Saberi F.A. Botulinum Toxin: Mechanisms of Action. European Neurology 2005; 53: 3-9
- 90.** Jankovic J. Botulinum Toxin In Clinical Practice. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2004; 75: 951-7.
- 91.** Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins Affecting Neuroexocytosis. Physiol. Rev. 2000; 80: 717-66.
- 92.** dePaiva A, Meunier FA, Molgo J, Aoki KR, Dolly JO. Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 3200-3205.
- 93.** Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins Affecting Neuroexocytosis. Physiol. Rev. 2000; 80: 717-66.
- 94.** Coffeild J, Considine RV, Simpson LL. The Site And Mechanism Of Action Of Botulinum Neurotoxin. In: Jankovic J, Hallet M (eds). Therapy with botulinum toxin. Marcel Dekker. 1994; 3-13.
- 95.** Brin MF, Aoki KR. Botulinum Toxin Type A: Pharmacology. In Nathaniel H. Mayer, David M. Simpson eds. Spasticity: Etiology, evaluation, management and the role of botulinum toxin, We move, 2002; 110-24
- 96.** Aktug Demir N, Sumer S, Ural O, Ozturk S, Celik JB. An Alternative Treatment Approach In Tetanus: Botulinum Toxin. Trop. Doct. 2011; 18: 553-559
- 97.** Hassel B. Tetanus: Pathophysiology, Treatment And The Possibility Of Using Botulinum Toxin Against Tetanus Induced Rigidity And Spasms. Toxins Basel 2013; 5(1): 73-83
- 98.** Canter HI, Kayikcioglu A, Aksu M, Mavili E. Botulinum Toxin In Closed Treatment Of Mandibular Condylar Fracture. Ann Plast Surg. 2007; 58: 474-8.

- 99.** Blitzer A, Brin MF, Fahn S, Lange D, Lovelace RE. Botulinum toxin (BOTOX) for the treatment of 'spastic dysphonia' as part of a trial of toxin injections for the treatment of other cranial dystonias. *Laryngoscope* 1986;96:1300-1301.
- 100.** Blitzer A, Brin MF, Greene PE, Fahn S. Botulinum toxin injection for the treatment of oromandibular dystonia. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1989;98:93-97.
- 101.** Grillone GA, Blitzer A, Brin MF, Annino DJ, Saint-Hilaire MH. Treatment of adductor laryngeal breathing dystonia with botulinum type A. *Laryngoscope* 1994;104:30-32.
- 102.** Boghen D, Flanders M. Effectiveness of botulinum toxin in the treatment of spasmodic torticollis. *Eur Neurol* 1993;33:199-203.
- 103.** Fregene A, Ditmars D, Siddiqui A. Botulinum Toxin Type A: A Treatment Option For Digital Ischemia In Patients With Raynaud's Phenomenon. *J Hand Surg Am.* 2009; 34: 446-52.
- 104.** Van Beek AL, Lim PL, Gear AJ. Management of Vasospastic Disorders With Botulinum Toxin A. *Plast Reconstr Surg.* 2007; 119: 217-26.
- 105.** Morris J, Jobling L, Gibbins IL. Differential Inhibition By Botulinum Neurotoxin A Of Cotransmitters Released From Autonomic Vasodilator Neurons. *Am. J. Physiol.* 2001; 281: 2124
- 106.** Sycha T, Graninger M, Auff E, Schnider P. Botulinum Toxin In The Treatment Of Raynaud's Phenomenon: A Pilot Study. *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 312-3.
- 107.** Neumeister MW, Chambers CB, Herron, MS. Botoks Therapy for Ischemic Digits. *Plast Reconstr Surg.* 2009; 124: 191-200.
- 108.** Xiao Z. Zhang F. Lin W. Zhang M. Liu Y. Effect Of Botulinum Toxin Type A On Transforming Growth Factor Beta-1 In Fibroblasts Derived From Hypertrophic Scar: A Preliminary Report. *Aesthetic Plast Surg.* 2010; 34(4): 424-7.
- 109.** Janis JE. Barker JC. Guyuron B. A Review Of Current Evidence In The Surgical Treatment Of Migraine Headaches. *Plast Reconstr Surg.* 2014;134(4 Suppl 2):131S-41S
- 110.** Berry MG. Stanek JJ. Botulinum Neurotoxin: A Review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2012;65(10):1283-91
- 111.** Finzi E. Wasserman E. Treatment Of Depression With Botulinum Toxin A: A Case Series. *Dermatol Surg* 2006;32:645e9.

- 112.** Havas D, Glenberg A, Gutowski K, Lucarelli M, Davidson R. Cosmetic Use Of Botulinum Toxin-A Affects Processing Of Emotional Language. *Psychol Sci* 2010;21:895e900.
- 113.** Dayan SH, Arkins JP, Patel AB, Gal TJ. A Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled Health-Outcomes Survey Of The Effect Of Botulinum Toxin Type A Injections On Quality Of Life And Self-Esteem. *Dermatol Surg* 2010;36:2088e97.
- 114.** Blitzler A, Brin MF, Stewart CF. Botulinum toxin management of spasmodic dysphonia (laryngeal dystonia): a 12- year experience in more than 900 patients. *Laryngoscope* 1998;108:1435-1441.
- 115.** Tuite PJ, Lang AE. Severe and prolonged dysphagia complicating botulinum toxin A injections for dystonia in Machado-Joseph disease. *Neurology* 1996;46:846.
- 116.** Klein AW. Complications With The Use Of Botulinum Toxin. *Int Ophthalmol Clin*. 2005; 43: 163-9.
- 117.** Dedo HH. Recurrent laryngeal nerve section for spastic dysphonia. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1976;S5:4,'51-459.
- 118.** Vartanian AJ, Dayan SH. Complications Of Botulinum Toxin A Use In Facial Rejuvenation. *Facial Plast. Surg. Clin. N. Am* 2003; 11: 483-92.
- 119.** Carruthers JD, Lowe NJ, Menter MA, Gibson J, Eadie N. Double-Blind, Placebo-Controlled Study Of The Safety And Efficacy Of Botulinum Toxin Type A For Patients With Glabellar Lines. *Plast Reconstr Surg*. 2003; 112: 21-30.
- 120.** Mannor GE. Practical Aspects Of Cosmetic Botulinum Toxin. *Int Ophthalmol Clin*. 2005; 43: 99-106.
- 121.** Aoki KR. Pharmacology And Immunology Of Botulinum Toxin Serotypes *J Neurol*. 2001;248:3-10
- 122.** Aoki KR. Preclinical Update Of BOTOX (Botulinum Toxin Type -A) Purified Neurotoxin Complex Relative To Other Botulinum Toxin Preparations. *Eur J Neurology*. 1999; 6: 3-10.
- 123.** Aras MD, Çakıcı A. İnme Rehabilitasyonu İçinde; Oğuz H, Dursun E, Dursun N (yazarlar), Tıbbi Rehabilitasyon, Nobel Tıp Kitabevleri, 2004; 589- 617.
- 124.** Borodic GE, Ferrante R. Effects of repeated botulinum toxin injections on orbicularis oculi muscle. *Journal of Clinical Neuro-Ophthalmology* 1992;12:121-127.

- 125.** Rhew K, Fiedler DA, Ludlow CL. Technique for injection of botulinum toxin through the flexible nasolaryngoscope. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;114:787-794.
- 126.** Moore AP, Wood GD. Medical treatment of recurrent temporomandibular joint dislocation using botulinum A. *Br Dent J* 1997;183:415-417.
- 127.** Schantz EJ, Johnson EA. Preparation And Characterization Of Botulinum Toxin Type A For Human Treatment. In: Joseph Jankovic, Mark Hallet. *Therapy with Botulinum Toxin*, New York: Marcel Dekker: 1994; 41-50.
- 128.** Borodic GE, Pearce LB, Smith K, Joseph M. Botulinum A toxin for spasmodic torticollis: multiple vs. single injection points per muscle. *Head Neck* 1992;14:33-37.
- 129.** Lowe, N.J. Botulinum Toxin Type A For Facial Rejuvenation. *Dermatol. Surg.* 1998; 24: 1216-8.
- 130.** Kim HS, Hwang JH, Jeong ST, Lee YT, Lee PK, Suh YL, Shim JS. Effect Of Muscle Activity And Botulinum Toxin Dilution Volume On Muscle Paralysis. *Dev. Med Child Neurol*, 2003; 45:200-6.
- 131.** Allergan Corporation. Botox Cosmetic (Botulinum Toxin Tipe A) Purified Neurotoxin complex. Irvine, Clif: Allergan corporation 2002.
- 132.** Kane M. Nonsurgical Treatment of Platysmal Bands with Injection of Botulinum Toxin A. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 112: 115-122.
- 133.** Rohrich RJ, Janis JE, Fagien S, Stuzin JM. The Cosmetic Use of Botulinum Toxin. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 112: 177-187.
- 134.** Lam DGK, Choudhary S. Use of a Grid to Simplify Botulinum Toxin Injection for Axillary Hyperhidrosis. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 112: 1741-2.
- 135.** Kavanagh GM. Use Of A Grid To Simplify Botulinum Toxin Injection For Axillary Hyperhidrosis. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(1):317
- 136.** Kim KT, Kerwin E, Landwehr L, Bernstein JA, et al. Use of 0.06% ipratropium bromide nasal spray in children aged 2 to 5 years with rhinorrhea due to a common cold or allergies. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005;94:73-9.
- 137.** Rohrbach S, Olthoff A, Laskawi R, Giefer B, Gotz W. Botulinum toxin type A induces apoptosis in nasal glands of guinea pigs. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001;110(11):1045-50.

- 138.** Coskun BU, Savk H, Cicek ED, Basak T, Basak M, Dadas B. Histopathological and radiological investigations of the influence of botulinum toxin on the submandibular gland of the rat. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2007) 264:783–787
- 139.** Eröz R, Karataş A, Alkoç OA, Baltacı D, Oktay M, Çolakoğlu S. Apoptozis Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması). *Düzce Tıp Dergisi* 2012; 14(2): 87-101
- 140.** Doggweiler R, Zermann DH, Ishigooka M, Schmidt RA (1998) Botox induced prostatic involution. *Prostate* 37:44–50
- 141.** Ellies M, Laskawi R, Tormahlen G, Gotz W (2000) The effect of local injection of botulinum toxin A on the parotid gland of the rat: an immunohistochemical and morphometric study. *J Oral Maxillofac Surg* 58:1251–1256