

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK, BURUN VE BOĞAZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**LİKOPENİN DENEYSEL MİRİNGOSKLEROZ ÜZERİNE
ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Evin DAŞ ŞAHİN**

**TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Şinasi YALÇIN**

**ELAZIĞ
2013**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Şinasi YALÇIN

Kulak Burun Boğaz ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şinasi YALÇIN

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Şinasi YALÇIN

Prof. Dr. Turgut KARLIDAĞ

Doç. Dr. Burak TURGUT

Oğlum Ali Aras'a...

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında gerekli her türlü desteği ve yardımı benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Şinasi YALÇIN'a; bizlere Kulak Burun Boğaz alanındaki uzmanlık bilgi ve becerisini kazandıran, mesleki, akademik ve sosyal tecrübelerini devamlı bizimle paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. İrfan KAYGUSUZ, Prof. Dr. Turgut KARLIDAĞ, Prof. Dr. Erol Keleş ve Doç. Dr. H. Cengiz Alpay'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tez çalışmamdaki katkılarından dolayı Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İbrahim H. ÖZERCAN'a teşekkür ederim.

Çalıştığım dönem boyunca birlikte olduğum asistan arkadaşlarıma, kliniğimizin hemşire, sekreter ve personellerine özellikle teşekkür etmek isterim.

Yaşamım boyunca karşılıksız sevgi ve desteklerini benden esirgemeyen, bugünlere gelmeme vesile olan aileme ve eşim Cem'e minnettarım.

ÖZET

Miringoskleroz, timpanik membranın lamina propriasındaki kollajen yapının hiyalin dejenerasyonu ve kalsifikasyonu ile karakterize bir hastalıktır. Bu çalışmanın amacı likopenin miringoskleroz oluşumu üzerine etkisini histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirmektir.

Çalışmaya, 28 guinea pigin 56 sağlam timpanik membranı dahiledildi. Denekler rastgele yedişerli dört gruba ayrıldı. Grup I'de (Kontrol grubu) miringotomi yapıldıktan sonra herhangi bir tedavi verilmedi. Grup II'de (Miringotomi sonrası likopen uygulanan grup) miringotomi yapıldıktan sonra birinci günden itibaren 10 mg/kg likopen suda eritilerek sonda yardımı ile günde bir defa aynı saatte oral verildi. Bu işleme yedi gün devam edildi. Grup III'de (Miringotomi öncesi ve sonrası likopen uygulanan grup) miringotomi yapılmadan 1 hafta önce likopen aynı şekilde ve dozda başlanarak yedi gün verildi. Sekizinci gün miringotomi yapıldıktan hemen sonra likopen verilerek aynı yöntem ve dozda yedi gün devam edildi. Grup IV'de (Miringotomi öncesi likopen uygulanan grup) miringotomi yapılmadan 1 hafta önce likopen aynı yöntem ve dozda başlanarak yedi gün verildi. Sekizinci gün miringotomi yapıldı. Miringotomiden sonra likopen verilmedi. Çalışma süresince grup I ve II'de birer guinea pigin ölmesi ve grup II'de bir kulakta enfeksiyon olması nedeniyle beş timpanik membran çalışma dışı bırakıldı.

Miringotomiden 14 gün sonra otomikroskopik olarak miringoskleroz değerlendirmesi yapıldı ve skorlandı. Dekapitasyon sonrası guinea piglerin bullaları çıkarılarak %10'luk formaldehit solüsyonuna koyuldu. Histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme için kesitler alınarak kalınlık, skleroz, inflamasyon ve kollajen-IV birikimi semikantitatif olarak skorlandı.

Bu çalışmada likopen ile tedavi edilen gruplarda miringosklerozun kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p<0.05$). Ayrıca kalınlık, inflamasyon, skleroz ve kollajen-IV birikiminin tedavi edilen gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p<0.05$). Likopenin miringotomiden önce ve/veya sonra verilmesinin miringoskleroz oluşumu açısından bir fark oluşturmadığı da saptanmıştır.

Sonuç olarak miringosklerozun oluşumunun önlenmesinde güçlü bir antioksidan olan likopen iyi bir seçenek olarak düşünülebilir.

Anahtar kelimeler: Miringoskleroz, likopen, antioksidan

ABSTRACT

THE EFFECT OF LYCOPENE ON EXPERIMENTAL MYRINGOSCLEROSIS

Myringosclerosis is a disease characterized with hyaline degeneration and calcification of collagen structure in lamina propria of tympanic membrane. The aim of this study is to evaluate the effect of lycopene on formation of myringosclerosis from histopathological and immunohistochemical aspects.

The fifty-six healthy tympanic membrane of 28 guinea pig were involved in study. Objects were separate into 4 groups randomly. In group I (control group), no treatment was implemented after application of myringotomy. In group II (where lycopene was given after myringotomy), 10 mg/kg lycopene was implemented orally through catheter by dissolving in water once a day after 1st day. This implication was continued for 7 days. In group III (where lycopene was given before and after myringotomy), lycopene implementation started one week before myringotomy with same dose and method for 7 days. By giving lycopene right after myringotomy at 8th day with same dose and method, it was continued for 7 days. In group IV (where lycopene was given before myringotomy), lycopene was given with same dose and method for 7 days one week before myringotomy. Myringotomy was implemented at 8th day. No lycopene was given after myringotomy. 5 tympanic membrane was excluded because of death of 1 guinea pig in each of group I and II and an ear infection in group II during study.

The fourteen days after myringotomy, auto-microscopic myringosclerosis evaluation was performed and scored. After decapitation, bullas of guinea pigs were dissected and put into 10% formaldehyde solution. For histopathologic and immunohistochemical evaluation, sections were taken and scored from aspects of thickness, scleroses, inflammation and collagen-IV accumulation.

Within this study, it was seen that myringosclerosis formation significantly decreased in groups treated with lycopene in proportion to control group ($p < 0.05$). Also it was seen that the thickness, inflammation, scleroses and collagen-IV accumulation significantly decreased in treated groups in proportion to control group ($p < 0.05$). It was determined that the implementation of lycopene after or before the myringotomy made no difference in terms of myringosclerosis formation.

As a result; lycopene which is a strong antioxidant is a good option for decreasing the myringosclerosis.

Keywords: Myringosclerosis, lycopene, antioxidant

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	3
1.1.1. Kulağın Anatomisi	3
1.1.1.1. Temporal Kemik	4
1.1.1.2. Aurikula ve Dış Kulak Yolu	6
1.1.1.3. Timpanik Membran	6
1.1.1.4. Orta Kulak	7
1.1.1.5. İç Kulak	8
1.1.2. Timpanik Membran Histolojisi	9
1.1.3. Guinea Pig Timpanik Membranı	9
1.2. Timpanik Membranda Yara İyileşmesi ve Miringoskleroz Oluşumu	10
1.3. Serbest Oksijen Radikalleri	11
1.4. Likopen	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM	14
2.1. Miringotomi	14
2.2. Çalışma grupları	15
2.3. Histopatolojik Ve İmmünohistokimyasal İnceleme	16

2.4. İstatistiksel Analiz	18
3. BULGULAR	19
4. TARTIŞMA	26
5. KAYNAKLAR	32
6. ÖZGEÇMİŞ	43

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Tüm grupların istatistiksel analiz sonuçları

25

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Kulak anatomisi	4
Şekil 2.	Kulak zarı	7
Şekil 3.	Guinea pig timpanik membranı	10
Şekil 4.	Likopenin kimyasal yapısı	12
Şekil 5.	Otomikroskopik görüş altında yapılan miringotomi	14
Şekil 6.	Otomikroskopik değerlendirmede miringosklerotik odak	16
Şekil 7.	Otomikroskopik değerlendirme şeması	16
Şekil 8.	Normal timpanik membran	17
Şekil 9.	Miringosklerozun tüm gruplara göre dağılımı	20
Şekil 10.	Timpanik membranda kalınlaşma	20
Şekil 11.	Timpanik membran ortalama kalınlığının tüm gruplara göre dağılımı	21
Şekil 12.	Timpanik membranda inflamasyon	22
Şekil 13.	İnflamasyonun tüm gruplara göre dağılımı	22
Şekil 14.	Timpanik membranda skleroz	23
Şekil 15.	Lamina propriadaki sklerozun tüm gruplara göre dağılımı	23
Şekil 16.	Timpanik membranda kollajen artışı	24
Şekil 17.	Lamina propriadaki kollajen birikiminin tüm gruplara göre dağılımı	25

KISALTMALAR LİSTESİ

HE	: Hematoksilen-Eozin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
L-NAME	:N-nitro L-arginine methyl ester
MT	: Mason-Trikrom
NO	: Nitrik oksit
NO₂	: Nitrit
NO₃	: Nitrat
O₂⁻	: Süperoksid anyonu
O₂	: Oksijen
OH	: Hidroksil
SOR	: Serbest oksijen radikali
TM	: Timpanik membran
VT	: Ventilasyon tüpü

1. GİRİŞ

Miringoskleroz, timpanik membranın lamina propriasındaki kollajen yapının hiyalin dejenerasyonu ve kalsifikasyonu ile karakterize bir hastalıktır (1-6). Efüzyonlu otitis media tedavisi kapsamında miringotomi yapılması ya da ventilasyon tüpü uygulamasını takiben ortaya çıkan bu durum çoğunlukla asemptomatik olsa da, özellikle büyük sklerotik plakların oluşması işitme kayıplarına neden olabilir (3, 6).

Miringoskleroz etiyopatogenezini açıklamak amacıyla çeşitli hipotezler öne sürülmüş olmakla birlikte son yıllarda üzerinde en çok durulan teori timpanik membranın kollajen tabakasında meydana gelen aşırı inflamatuvar reaksiyon ve doku hasarının olduğudur (4, 7, 8). Sağlıklı insanlarda ve hayvanlarda orta kulaktaki oksijen (O_2) konsantrasyonu %5-10 arasındadır. Efüzyonlu otitis media tedavisi sırasında miringotomi yapılması ya da ventilasyon tüpü uygulaması sonucunda orta kulakta O_2 konsantrasyonu artmakta ve dış ortamdaki O_2 düzeyine ulaşmaktadır. Yapılan çalışmalarda orta kulaktaki hiperoksik ortamın serbest oksijen radikali (SOR) oluşumuna neden olduğu, bu durumun da inflamatuvar süreci hızlandırarak doku hasarına ve miringoskleroz oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (2, 4, 8-12). Bu nedenle, SOR'un salınımının engellenmesi ve doku hasarını oluşturan inflamasyonun azaltılması miringoskleroz gelişimini önlemede asıl hedef haline gelmiştir.

Çeşitli nedenlerle meydana gelen akut timpanik membran perforasyonlarının büyük bir kısmı kendiliğinden iyileşir. Timpanik membranda görülen bu güçlü kendi kendine iyileşme yeteneğinin, sahip olduğu epitelyal yapının proliferasyon ve migrasyon aktivitesine bağlı olduğu düşünülmektedir (13).

Yapılan çeşitli çalışmalarda akut travmatik timpanik membran perforasyonu sonrası kendiliğinden oluşan tamir aşamaları ayrıntılarıyla açıklanmıştır (14-17). Perforasyondan sonraki ilk iki gün içerisinde, rezidüel timpanik membranın dıştaki epitel katında yoğun bir proliferasyon başlamaktadır. Rat timpanik membranındaki perforasyon iyileşme sürecinin, anulus ve manubrium mallei yakınındaki epitelde görülen mitotik aktivite ve proliferasyonla başladığını gösterilmiştir (18). Erken dönemdeki epitelyal proliferasyonun perforasyon kenarlarında değil de perforasyon alanından uzak olan anulus ve manubrium mallei civarında başlaması, yapılan çalışmalarda ortaya konulan önemli bir noktadır (18). Periferde proliferasyon alan epitel

hücreleri, perforasyon alanında biriken keratinin öncülüğünde perforasyon merkezine doğru ilerleyerek perforasyonun kapanmasını sağlarlar. Mukozal epitel tabakası ise perforasyon kapanma sürecinde daha az öneme sahiptir (13, 15). Epitelizasyonun tamamlanmasından sonra ise fibröz tabakanın oluşumu ortaya çıkar. Oluşan fibröz tabakanın tekrar yapılanması sonucunda perforasyon alanında daha ince bir zar yapısı oluşur. Bunun aksine perforasyon alanından uzak olan sağlam alanlarda ise timpanik membran kalınlığının artmış olduğu gösterilmiştir (16, 19).

İnflamasyondan sonra meydana gelen fibroblastik aktivite artışı ve kollajen sentezi, bu alanlarda timpanik membran kalınlığının artmasına neden olmaktadır. Miringoskleroz da timpanik membrandaki bu yara iyileşme sürecinin farklı dönemlerinde ortaya çıkabilen geri dönüşümsüz bir durumdur (20).

Yapılan çalışmalar perforasyondan sonraki dokuz ile onikinci saatlerden itibaren miringosklerozun görülmeye başladığını göstermiştir (21). Perforasyon sonrası başlayan inflamatuvar sürecin dokuzuncu saat gibi erken aşamasında gözlenen temel histolojik bulgusu, kollajen tabakadaki yoğun makrofaj infiltrasyonudur. Bu nedenle artmış makrofaj infiltrasyonu ile miringoskleroz gelişimi arasında yakın ilişki olduğu düşünülmektedir. İnflamasyonun erken döneminde aktive olan makrofajlardan salınan nitrik oksit (NO) ve diğer mediatörlerin neden olduğu doku hasarı, iyileşme sürecinde fibrosis ile sonuçlanmaktadır. Artmış fibroblastik aktivite ve kollajen sentezi hiyalinizasyona neden olmakta, hiyalinize alanlara kalsifikasyonun eklenmesi sonucunda da miringoskleroz oluşmaktadır(22).

Nitrik oksit, vücuttaki hem fizyolojik hem de patofizyolojik süreçlerde rol oynayan önemli bir serbest radikaldir. Fizyolojik olaylarda mediatör görevi yapan NO, sürekli otonomik kontrol altında ve belirli konsantrasyonlarda üretilmekte ve fizyolojik sürecin devamlılığında önemli bir rol üstlenmektedir. İnflamasyon gibi patolojik süreçlerde ise kontrolsüz şekilde ve yüksek miktarlarda sentezlenebilmekte ve böylece doku hasarına neden olabilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda ve oksijen yokluğunda stabil olan NO'nun yarılanma ömrü çok kısadır (6-20 saniye) ve hızla inaktif metabolitleri olan nitrat (NO_3) ve nitrite (NO_2) dönüştürülür (23). Yüksek konsantrasyondaki NO ise ortamda bulunan O_2 ve SOR ile reaksiyona girerek hücre hasarına neden olan etkiler gösterir. Bu hasar antioksidan madde kullanımı ile engellenebilmektedir.

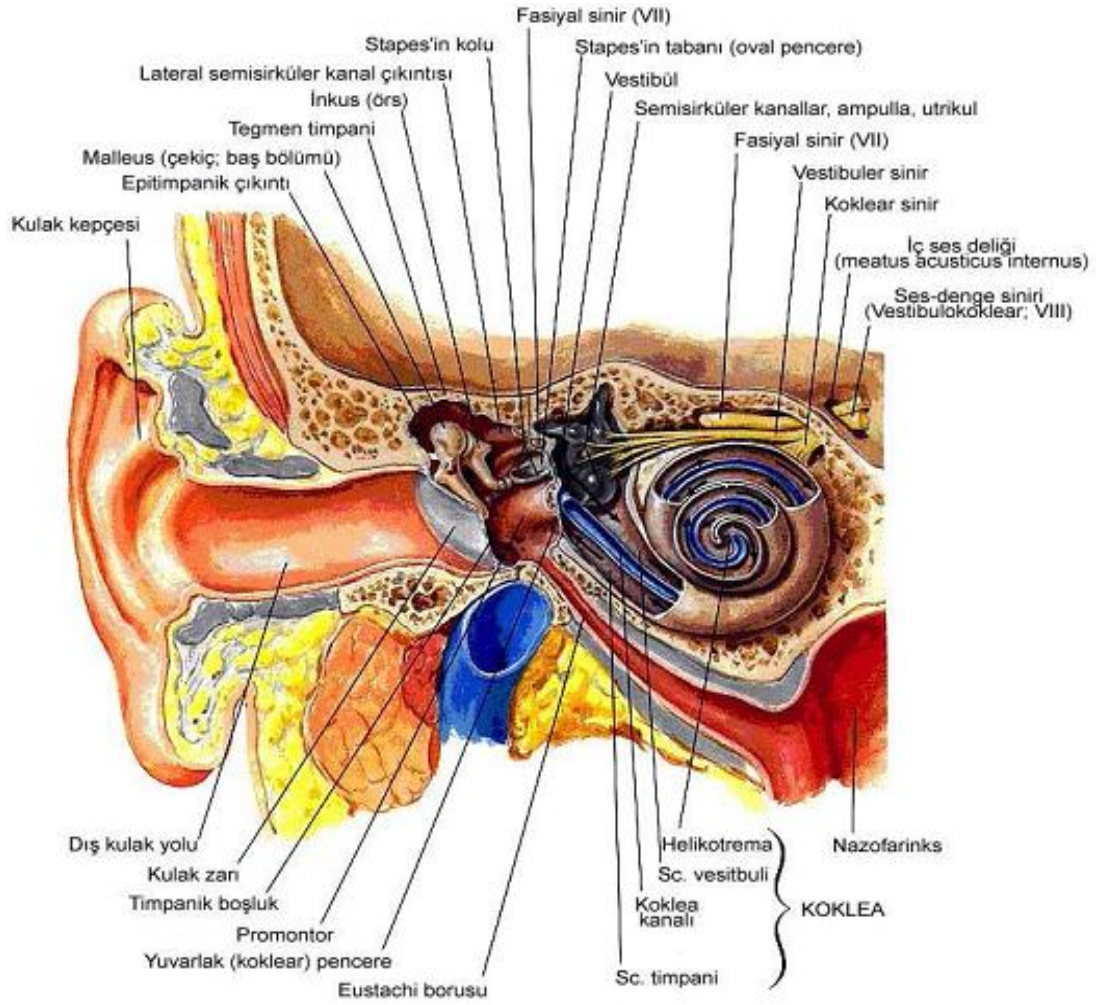
Bitkisel antioksidanların iki önemli sınıfı karotenoidler ve polifenollerdir (24). Likopen meyve, sebze ve yeşil bitkilerde bulunan karotenoid bileşikler ailesinin üyesidir. Bitkilerde bu bileşikler fotosentetik mekanizmanın bir parçası olup sarı, turuncu ve kırmızı renkli meyve-sebzelerin renginden sorumludur. En iyi bilinen likopen kaynakları domates, işlenmiş domates ürünleri, karpuz, pembe greyfurt ve kayısıdır (24-26). Likopen insan vücudunda yaygın olarak dağılmıştır (27-33). Karaciğer, böbrek, adrenal bezler, testis, over ve prostat gibi farklı dokularda bulunur (34, 35). Provitamin A aktivitesine sahip olmamasına rağmen likopen antioksidan olarak görev yapabilmekte ve aktif oksijenin etkisini engelleyebilmektedir (36-38). Likopenin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve NO radikallerini inaktive ettiği bildirilmiştir (39).

Bu çalışmanın amacı güçlü bir antioksidan olan likopenin miringoskleroz oluşumu üzerine etkisini histopatolojik olarak değerlendirmektir.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Kulağın Anatomisi

İşitme ve dengenin periferik organı olan kulak, temporal kemiğin içine yerleşmiş, yapıları ve görevleri birbirinden farklı üç bölümden oluşmaktadır. Bunlar dıştan içe doğru, aurikula ve dış kulak yolunu içeren dış kulak, kulak zarı, kemikçikler, mastoid hücreleri ve Östaki borusunu içeren orta kulak ve vestibüler sistemi (semisürküler kanallar, utrikül ve sakkül), kokleayı ve internal akustik kanalı içeren iç kulaktır (40) (Şekil 1).



Şekil 1. Kulak anatomisi

1.1.1.1. Temporal Kemik

Temporal kemik kafatasının yan ve alt duvarlarının bir kısmını oluşturur. Temporal kemik petröz, mastoid, timpanik ve skuamöz olmak üzere dört ayrı parçadan oluşmaktadır (40).

Skuamöz Parça: Kafatasının yan duvarının bir kısmını oluşturur. Düz olan dış yüzüne temporal kas yapışmaktadır. Dış yüzün alt kısmından öne doğru uzanan çıkıntıya prosesus zigomaticus denilmektedir. Bu çıkıntının inferiorunda mandibuler fossa bulunmaktadır. Dış yüzün arka kısmında a. Temporalis media'ya ait bir oluk bulunur. Skuamöz parça iç yüzü ile orta kafa çukuru ile komşuluk halindedir (40).

Mastoid Parça: Temporal kemiğin üst ve arka kısmında bulunmaktadır. Skuamöz parçanın petröz parça ile birleşmesinden oluşan petroskuamöz sütür hattı, zigomatik kökten aşağıya doğru uzanır ve buna linea temporalis superior adı

verilmektedir ve bu hat orta kafa çukurunun alt kısmının sınırını yapar. Dış kulak yolunun arka üst kısmında küçük bir kemik spin bulunur. Bu spine suprameatal spine veya Henle spini adı verilir. Bu spinin arkasında lamina kribrosa adı verilen delikli bir kısım vardır (40).

Mastoidin iç yüzünde bir oluk bulunur, buna sigmoid sulkus denir. Bu sulkusa sigmoid sinüs yerleşir. Mastoid parçanın üst yüzeyinde antrumu örten ince bir kemik tabakası vardır. Buna tegmen mastoideum denir. Arkada, petröz parçanın arka yüzü ile birlikte arka kafa çukurunun ön sınırını yapar. Mastoid kemik havalı boşluklarla doludur. Bu hava boşluklarının en büyüğü ve en önemlisi, her zaman bulunan antrumdur (40).

Petröz Parça: Bir piramide benzeyen petröz kemiğin ön üst yüzü orta kafa çukurunun bir bölümünü yapar. Ön üst yüzde bir çukur alan vardır ve bu çukurda beşinci kraniyal sinirin ganglionu “Gasser ganglionu” bulunmaktadır. Bu çukur alanın hemen yanında birbirine paralel giden iki ince oluk vardır. Bu arkadaki oluktan n. petrozus superfisialis major, önünden n. petrozus superfisialis minor geçer. Bu olukların dış yan kısmında eminensia arkuata adı verilen bir kabarıklık vardır. Bu kabarıklığın yanındaki düzgün alana tegmen timpani denir. Burası orta kulak boşluğunun tavanını oluşturur ve malleusun başı ile komşuluk yapar (40). Petröz kemiğin arka üst kısmında meatus akustikus internusun deliği olan porus akustikus internus bulunur. Buradan fasiyal sinir, n. koklearis, n. vestibularis superior ve n. vestibularis inferior geçmektedir (41).

Petröz parçanın alt yüzündeki çıkıntıya prosesus styloideus adı verilir. Bu çıkıntının hemen arkasında bulunan deliğe foremen stilomastoideum adı verilmekte olup, bu delik fallop kanalının dış deliğini oluşturmaktadır. Prosesus stilomastoideusun iç yan ve ön kısmında fossa jugularis adı verilen geniş bir çukur alan vardır. Bu çukur alanın hemen ön kısmında kanalis karotikusun deliği bulunur (40,41).

Timpanik Parça: Dış kulak yolunun ön ve arka kısmını ve alt kısmının bir bölümünü yapar. Timpanik kemik üst kısmı açık bir halka görünümündedir. Buraya Rivinus çentiği denir. Timpanik membranın pars tensası sulkus timpanikusa, pars flaksidası ise halkanın açık olan kısmına yerleşmektedir (41). Temporal kemik çocuklarda ise lateral-inferior pozisyonunda, erişkinlerde lateral pozisyonudadır.

Bebeklerde skuamöz segment diğerlerine oranla rölatif olarak daha büyüktür, mastoid parça gelişmemiştir. Orta kulak boşluğu dış yanda timpanik kısım, iç yanda petröz kısım ile sınırlıdır. Antrum doğumda iyi gelişmemiştir. Dış tarafta ve önde skuamöz segment, ön ve arkada petröz segment ile komşuluk yapmaktadır (40).

1.1.1.2. Aurikula ve Dış Kulak Yolu

Dış kulak, aurikula ve dış kulak yolundan (DKY) oluşur. Aurikula düzensiz elastik fibrokartilaj ve bunu kaplayan perikondrium ve ciltten oluşur. Timpanik kemiğe, fibrokartilajınöz kanalla ve daha zayıf olarak anterior, superior, posterior auriküler ligamentlerle bağlı haldedir (41, 42). Aurikulanın işitsel uyarıları alma ve arttırma fonksiyonları vardır. Ayrıca aurikula, atmosferdeki ses dalgalarının uzaklığının ve lokalizasyonunun belirlenmesine katkıda bulunmaktadır (43).

Dış kulak yolu ön kısmındaki çıkıntıya ‘tragus’ denir (43). DKY, kavum konkadan timpanik membrana kadar olan bölümdür. Lateralde kartilaj kısım (DKY’nin 1/3 dış kısmı), medialde ise kemik kısımdan (DKY’nin 2/3 iç kısmı) ibaret olan S seklinde bir kanaldır. DKY’nin arka duvarının uzunluğu yaklaşık 25 mm, ön alt duvarının uzunluğu ise yaklaşık 31 mm dir. Bu fark kulak zarının arkadan öne doğru oblik yerleşmesinden dolayı oluşmaktadır. DKY ses dalgalarını sadece yönlendirmekle kalmaz aynı zamanda şiddetlendirir. (41, 44). Aurikula ve DKY’nin duysal inervasyonu V, VII, X kranial ve 2-3. servikal sinirlerden sağlanır (41, 44).

1.1.1.3. Timpanik Membran

Timpanik membran (TM), orta kulak boşluğunu DKY’den ayıran elips şeklinde bir perdedir (Şekil 2). Kalınlığı 0.1 mm, uzunluğu 10-11 mm, genişliği ise 8-9 mm’dir. TM, orta kulağın dış duvarının büyük bir kısmını yapar. TM’nin timpanik kemikte yerleştiği yer olan sulkus timpanikusa “timpanik halka” adı verilmektedir. TM anulus fibrozus ile timpanik halkaya, santral bir yapışıklıkla da malleusun kısa koluna ve manibrium mallei’ye bağlıdır (44).

Timpan membran, pars tensa ve pars flaksida olarak iki ayrı bölümden 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 ve histolojik farklar söz konusudur. Pars tensada bulunan fibröz doku, pars flaksidada yoktur (43).

Ayrıca pars tensa damar ve sinir yönünden daha zengindir. TM'nin kanlanması lamina propria ile bağlantısı olan epidermal ve mukozal yüzeylerden gelen kan damarları ile sağlanır. TM dış yüzünün arteriyel kanlanması internal maksiller arterin bir dalı olan derin aurikuler arter, iç yüzünün kanlanması ise posterior aurikuler arter ve timpanik arter ile olur. Kulak zarının venleri arterlere eşlik eder (43). Kulak zarının duyuşal innervasyonu N. Trigeminus'un n. mandibularis dalına ait aurikulotemporalis dalı, N. Vagus'un aurikuler dalı, N. Fasialis'in aurikuler dalı ve N.Glossofaringeus'un timpanik dalı tarafından sağlanır (44).



Şekil 2.Kulak zarı (sol)

1.1.1.4. Orta Kulak

Orta kulak, TM ile kemik labirent arasında muköz membran ile kaplanmış kemik mesafedir. Vertikal ve ön arka çapı yaklaşık olarak 15 mm'dir. İç derinliğı ise yukarı kısımlarda 6 mm, umbo çevresinde ise 2 mm kadardır. Orta kulak boşluğunda dış kulaktan iç kulağı ses dalgalarının iletimini sağlayan malleus, inkus ve stapes denilen üç adet kemikçik bulunur. Bu kemikçikler orta kulak boşluğunda kulak zarı ile iç kulağın fonksiyonel girişı olan oval pencere arasında bir köprü oluşturur ve sesin iletimini sağlarlar. Kemikçikleri orta kulak duvarlarına bağlayan dört ligament

(arka, ön, üst ve dış malleolar ligament) ve iki kas (m. tensor timpani, m. stapedius) bulunur (41-44). Tensor timpani kası, malleusun manibriumuna yapışırken, stapes kası ise stapesin boynuna yapışır. Bu kaslar kemikçik sisteminin hareketini kısıtlayarak şiddetli seslere karşı iç kulak yapılarının korunmasında da rol oynamaktadırlar (41-44).

Orta kulak boşluğunun tavanını tegmen timpani oluşturur ve orta kulak boşluğunu orta kafa çukurundan ayırır. Tabanı ise hipotimpanik resesi meydana getirir ve alt ön kısımda arteria karotis interna ile alt arka kısımda juguler bulbusla yakın komşuluktadır (44). Orta kulak boşluğunun arka duvarı aditus ad antrum vasıtasıyla mastoid antrum ve havalı hücreler ile devamlılık göstermektedir. Önde orta kulak boşluğu östaki tüpü aracılığıyla nazofarenks ile bağlantı halindedir. Orta kulak boşluğunun lateral duvarı kulak zarı ile epitimpanik resesin yan duvarı tarafından oluşturulmuştur. Medial duvarın en önemli yapılarından biri kokleanın bazal turunun yan duvarının yaptığı kabarıklık nedeni ile dışa doğru bombeliği ile oluşan promontoryumdur. Orta kulak boşluğunun medial duvarındaki diğer önemli yapılar stapes tabanının oluşturduğu oval pencere ile koklear kapsülün orta kulak boşluğuna diğer açılım yeri olan yuvarlak penceredir (43, 44).

Orta kulağın temel fonksiyonu, timpanik membrana ulaşan ses dalgalarını koklear sıvıları titreştirecek forma dönüştürmektir. Kokleaya direkt olarak gelen ses dalgaları kokleadaki sıvıları titreştirmek için çok etkisiz kalmaktadır. Orta kulak, hava ile koklea içi sıvı arasındaki akustik impedans farkını azaltır. Bu mekanizmada başlıca kulak zarı ile stapes tabanı arasındaki oran farkı ve orta kulak kemikçiklerinin kaldıraç fonksiyonu rol oynar (44).

1.1.1.5. İç Kulak

İç kulak, petröz kemik içinde bulunur. İşitme ve denge organlarını barındırır. Kemik labirent ve zar labirent olmak üzere iki kısımda incelenir. Kemik labirent perilenf, membranöz labirent ise endolenf içermektedir. Kemik labirent üç parçadan oluşur. Bunlar; koklea, vestibül ve kemik semisirküler kanallardır. Membranöz labirent de üç parçadan oluşur. Bunlar koklea, vestibülde yer alan iki otolit organ (utrrikulus, sakkulus) ve arka labirentteki üç semisirküler kanaldır (44).

1.1.2. Timpanik Membran Histolojisi

Timpanik membranın pars tensa kısmı üç tabakadan oluşur. Dışta, dış kulak yolu cildinin devamı olan epitel tabakası, ortada fibroblastlar, endotel hücreleri ve sinirleri bulunduran lamina propria (fibröz tabaka), içte ise orta kulak mukozasının silyalı küboid epitel tabakası mevcuttur. Fibröz tabaka dışta radial, içte ise sirküler liflerden yapılmıştır. Radial ve sirküler lifler temel olarak kollajen fibrillerden oluşur. Sirküler lifler periferde ve perifere yakın olan kısımlarda bulunur. Zarın umboya yakın kısımlarında ise yalnızca radial lifler bulunur. Pars tensanın uç kısımlarında fibröz tabaka kalınlaşarak anulus fibrokartilajinosus adı verilen halkayı meydana getirir. Pars flaksida da fibröz tabaka olmamasına karşın zengin kapiller ağ ve sinirler bulunur. Pars flaksidanın lamina propriası, pars tensadan daha kalın ve daha az organize olmasıyla ayrılır. Ayrıca pars flaksidada kollajen ve elastik lifler zemin üzerinde gevşek dizilmiştir. Buna karşılık pars tensada kollajen lifler ve birkaç elastik lif daha düzenli dizilmiştir (42, 44, 45).

1.1.3. Guinea Pig Timpanik Membranı

Timpanik membran, orta kulak boşluğunu dış kulak yolundan ayıran bir perde özelliğindedir. Renk ve şekil olarak insan timpanik membranı ile benzer özelliklere sahiptir (Şekil 3). Guinea piglerde timpanik membran sadece pars tensadan oluşur. Pars flaksida yerinde ise kemik bir lamel olan supratimpanik krest bulunur. İnce olup oldukça şeffaftır (46). Zira lateralinden bakıldığında orta kulaktaki major oluşumlar rahatlıkla izlenir. İnce bir yapısı olması nedeniyle diseksiyonlar esnasında kolayca yırtılabilir. Göksu (47) ve Kayhan'ın (48) yaptığı histolojik çalışmalarda, timpanik membranın fibröz tabakadan yoksun olduğu ve sadece anulusa yakın kısımlarda nadiren kollajen fibrillere rastlandığı bildirilmiştir. Bu bulgular kobay timpanik membranının neden bu kadar şeffaf ve travmaya hassas olduğunu izah eder. Ortalama çapı vertikal düzlemde 7 mm, horizontal düzlemde 8 mm'dir. Fibril anulusu bulunmayan timpanik membran kemik anulusun serbest kenarına sıkıca tutunur. Dış kulak yolundan zira doğru bakıldığında manibrium malleinin çok büyük olduğu ve vertikal düzlemde timpanik membran boyunca uzandığı izlenimi uyanır. Timpanik membranın infero-lateralinde dış kısmı timpanik halka ve timpanik bulla ile çevrili gizli bir boşluk bulunur (46).



Şekil 3. Guinea pig timpanik membranı

1.2. Timpanik Membranda Yara İyileşmesi ve Miringoskleroz Oluşumu

Timpanik membran perforasyonları akut ve kronik perforasyonlar olarak sınıflandırılır. Akut TM perforasyonlarının nedenleri arasında akut otitis medianın süpüratif evresi, travma ve iyatrojenik nedenler; kronik perforasyonlarının nedenleri arasında miringotomi sonrası ventilasyon tüpü (VT) uygulanması, kronik otitis media, travma ve diğer nedenler sayılabilir. Timpanik membranın güçlü bir kendi kendine iyileşme yeteneği vardır ve çoğu TM perforasyonları kendi kendine iyileşir (13, 49).

Yara iyileşmesi hemostaz, inflamasyon, proliferasyon, (remodelling) ve kontraksiyon olarak adlandırılan iç içe geçmiş fazlardan oluşmaktadır (49, 50). Hasar oluşur oluşmaz trombositler yara bölgesine göç eder ve trombüs oluşur. Daha sonra oluşan vazokonstriksiyonla hemostaz sağlanır. İlk birkaç saat sonra hasar bölgesine migrasyon gösteren makrofajlar ve polimorfonükleer lökositlerden salınan sitokinler, vasküler geçirgenliğin artmasına ve ödem oluşumuna neden olurlar (49). Birçok yara iyileşmesinde, öncelikle granülasyon dokusu oluşur sonra üzerini epitel tabakası örtterek yaranın kapanması sağlanır. Epitelyum kapandıktan sonra yeniden şekillenme (remodelling) başlar. Bunun sonucunda granülasyon dokusunun matür skar dokusu olması ve kontraksiyon oluşması ile son bulur.

Timpanik membranın yara iyileşmesi, vasküler dağılıma bağlı olarak başlangıçtaki hemostatik ve enflamatuvar evrelerinde sıradan olmasına rağmen

proliferasyon ve migrasyon safhalarında diğer dokulardan tamamen farklıdır. TM'deskuamöz epitel tabakası başlangıçta yara üzerinde bir köprü oluştururken fibröz yapının yeniden oluşması bunu takip eder. Oluşan yeni TM incilmesi özellikle fibröz tabakanın yeniden şekillenmesiyle olur (51). Bunun yanında perforasyon alanından uzak olan sağlam alanlarda, inflamasyondan sonra oluşan fibroblastik aktivasyon ve kollajen sentezi nedeniyle TM kalınlığının artmış olduğu görülmektedir (31, 35, 52).

Yapılan çalışmalarda histolojik olarak MS'nin perforasyondan sonraki dokuz ile onikinci saatlerde başladığı bildirilmiştir (21). Perforasyon sonrası başlayan inflamasyon sürecinde bu saatlerde makrofajların en yoğun olduğu ve kollajen oluşumunun arttığı gözlenmiştir (21). Makrofaj infiltrasyonu ile MS oluşumu arasında yakın ilişki olduğu düşünülmüştür. Bunun da makrofajlardan salınan NO ve SOR'un doku hasarına neden olduğu gösterilmiştir (9-12). Bu da inflamasyon, eksudasyon, granülasyon, fibrozis, hiyalinizasyon ve kalsifikasyona neden olarak miringoskleroz oluşumuna yol açmaktadır (53).

1.3. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya birden fazla paylaşılmamış (eşleşmemiş) elektron taşıyan atom veya moleküllerdir. Paylaşılmamış elektronlarından dolayı stabil olmayan, oldukça reaktif, çok kısa yarı ömürlü, hücrenin tüm bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliğine sahip maddelerdir (54, 55).

Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen ana kaynağı oksijen olmakla beraber, nitrik oksid (NO), aktive nötrofil, makrofaj, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranında da bulunmaktadır (56). Serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler (56).

Yüksek konsantrasyonlardas erbest radikaller ve radikal türevi, radikal olmayan reaktif türler canlı organizmalar için tehlikelidir ve tüm hücre yapılarına hasar verirler. Bununla birlikte, düşük konsantrasyonlarda nitrik oksit, süperoksit anyonu ve reaktif oksijen türleri sinyal iletiminde düzenleyici medyatör olarak önemli rol oynarlar. Reaktif oksijen türevlerinin aracılık yaptığı birçok cevap,

asında hücreleri oksidatif strese karşı koruyarak redoks homeostazını yeniden oluşturlar (56).

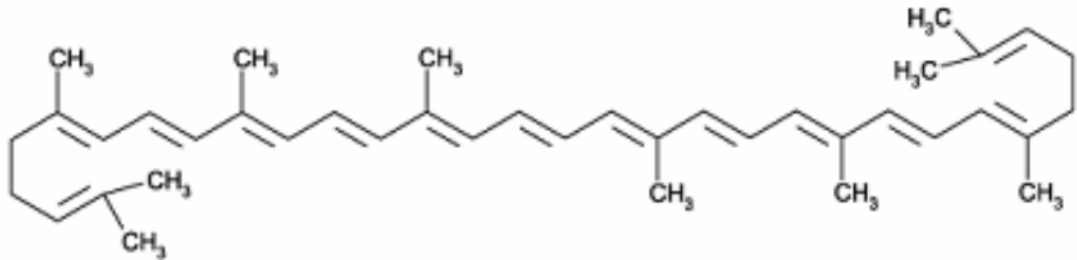
Moleküler oksijenin indirgenmesi sonucunda süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri oluşur (57). SOR endojen olarak vücutta sentezlenen metabolik yan ürünlerdir. Vücutta normal veya patolojik olarak serbest radikaller üretilir. Bu ürünler hemen sentez edildikleri yerde detoksifiye edilmezler ise zararlı etkilerini oluşturlar (56, 57). Bu ürünlerin detoksifikasyonu için antioksidan savunma elemanları kullanılır. Bunlar, hücre içi antioksidanlar süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleridir. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan E ve C vitamini, transferrin, haptoglobin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, beta karoten ve α -1 antitripsin sorumludur (56, 57).

1.4. Likopen

Diyet kaynaklı bir antioksidan olan likopen, son yıllarda insan sağlığına yararlı önemli bir kimyasal olarak oldukça ilgi çekmektedir. Bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentez edilirken hayvan ve insanlarda üretilmezler (24-26). Domates ve domates ürünlerine koyu kırmızı rengini verirler.

Likopen suda erimeyen lipofilik bir bileşiktir. Alınan likopen diyetteki lipid miçellerine katılır ve barsak mukozasından pasif difüzyon yoluyla emilir. Daha sonra şilomikronlara dahil olur ve karaciğere taşınmak üzere lenfatik sisteme salınır. Farklı organlara dağılımı plazma içerisindeki lipoproteinler tarafından sağlanır (58).

Likopen kimyasal olarak düz bir sıra halinde dizilmiş 11 konjuge ve 2 konjuge olmamış çift bağ içeren açık hidrokarbon zincirinden oluşmaktadır (Şekil 4). Moleküler formülü $C_{40}H_{56}$ olup molekül ağırlığı 536,85 daltondur (59).



Şekil 4. Likopenin kimyasal yapısı (60)

Likopenin antioksidan özellikleri, biyolojik etkileri içerisinde esas araştırma konusunu oluşturmaktadır. Bir antioksidan olarak etki gösterirken reaktif oksijen türevlerini yakalar, oksidatif stres hasarını azaltarak immün sistemi düzenler (61).

Likopenin antioksidan etkisi ile ilgili yapılan *in-vitro* çalışmalarda, bu karotenoidin güçlü bir radikal temizleyicisi olduğu bildirilmiştir (62). Likopen aktif oksijeni fiziksel ya da kimyasal yollarla bağlayabilmektedir. Fiziksel bağlanma kimyasal olandan çok daha etkilidir ve aktif oksijenden aktiflik enerjisinin karotene transfer edilmesiyle oksijenin normal duruma getirilmesi esasına dayanır. Aktive edilmiş karotendeki enerji ise dönme ve titreme etkileşimleriyle ortamdaki çözücüye iletilir ve karoten tekrar normal enerji seviyesine dönerken ortam sıcaklığı artar. Bu işlem birçok kez devam edebilir. Kimyasal mekanizma ile serbest radikal bağlanma oranı çok düşüktür. Bu oran toplam aktivite içinde sadece %0,05'tir (63). Likopenin H₂O₂ ve NO radikallerini inaktive ettiği bildirilmiştir. Lenfositlerde membran hasarı ve hücre ölümlerine yol açan NO radikaliyle karşı likopenin β-karotenden en az iki katı kadar daha etkili koruma sağladığı bildirilmiştir (64).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için öncelikle Fırat Üniversitesi Hayvan Deneylei Etik Kurulu'ndan deneysel hayvan çalışması onayı (22.11.2011 tarih ve 129 sayılı yazı) alındı. Çalışmada Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen ve ağırlıkları 400-800 g arasında değişen, dış kulak yolları ve kulak zarları sağlam, yetişkin 28 adet guinea pig kullanıldı. Guinea pigler, adaptasyon sağlayabilmeleri için deneye başlamadan bir hafta önce Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde yedişerli olarak dört gruba ayrılarak özel yemlerle ve limitsiz suya ulaşabilecekleri düzeneklerde günlük bakımları yapılarak barındırıldı.

2.1. Miringotomi

İntraperitoneal 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Pfizer Warner Lambert, ABD) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (Ksilazol, Provet Veteriner Ürünleri Sanayi İstanbul, Türkiye) enjeksiyonuyla sağlanan anestezi sonrası yapılan otomikroskopik bakıda bilateral normal TM'ye sahip olduğu görülen 28 adet guinea pigin 56 TM'si çalışmaya dahil edildi. Otomikroskopik görüş altında, kulak spekulumu ve steril miringotom bıçağı (D-481, D-242, Aygün Cerrahi Aletler, Samsun, Türkiye) kullanılarak her iki TM'nin ön alt kadranına 1 mm çapında standart miringotomi Likopenin verilme zamanlarına göre yapıldı (Şekil 5).



Şekil 5. Otomikroskopik görüş altında yapılan miringotomi (sağ timpanik membran)

2.2. Çalışma grupları

Grup I (Kontrol grubu n: 14): Bu grupta 7 guinea pigın 14 TM'sine miringotomi yapıldıktan sonra herhangi bir tedavi verilmedi.

Grup II (Miringotomi sonrası likopen verilen grup, n: 14): Bu grupta 7 guinea pigın 14 TM'sine miringotomi yapıldıktan sonra birinci günden itibaren 10 mg/kg likopen suda eritilerek sonda yardımı ile günde bir defa aynı saatte oral yolla verildi. Bu işleme yedi gün devam edildi.

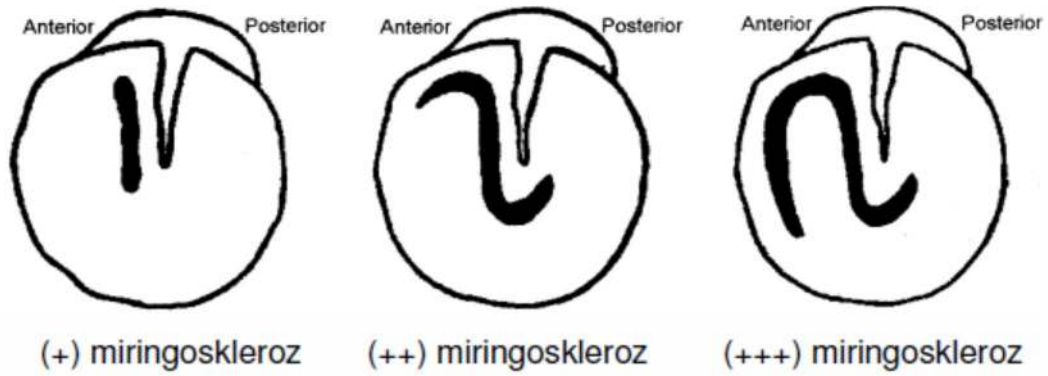
Grup III (Miringotomi öncesi ve sonrası likopen verilen grup, n: 14): Bu grupta 7 guinea pigın 14 TM'sine miringotomi yapılmadan 1 hafta önce 10 mg/kg likopen suda eritilerek sonda yardımı ile günde bir defa aynı saatte oral yolla verildi. Bu işleme yedi gün devam edildi. Sekizinci gün miringotomi yapıldı ve aynı şekilde ve dozda likopen yedi gün daha verilmeye devam edildi.

Grup IV (Miringotomi öncesi likopen verilen grup, n: 14): Bu grupta 7 guinea pigın 14 TM'sine miringotomi yapılmadan 1 hafta önce 10 mg/kg likopen suda eritilerek sonda yardımı ile günde bir defa aynı saatte oral yolla verildi. Bu işleme yedi gün devam edildi. Sekizinci gün miringotomi yapıldı. Miringotomiden sonra likopen verilmedi.

Miringotomiden 14 gün sonra otomikroskopik olarak miringoskleroz değerlendirmesi yapıldı (Şekil 6). Buna göre; otomikroskopik bakıda görünür sklerotik lezyon yoksa (- veya 0), yalnızca malleus koluna komşu yerleşimli sklerotik lezyon varsa (+ veya 1), malleus koluna komşu sklerotik lezyonlarla birlikte ön üst kadranda da sklerotik lezyon varsa (++ veya 2), malleus kolundan anulusa ulaşan ve anulus boyunca uzanan geniş sklerotik lezyonlar varsa (+++ veya 3) olacak şekilde skorlandı (7) (Şekil 7).



Şekil 6. Otomikroskopik değerlendirmede miringosklerotik odak (sol timpanik membran)



Şekil 7. Otomikroskopik değerlendirme şeması (6)

Otomikroskopik değerlendirme yapıldıktan sonra hayvanlar yüksek doz intraperitoneal pentotal (Pental® Sodyum, İ. E. Ulagay İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye) enjeksiyonunutakiben dekapite edildi. Dekapitasyon sonrası guinea piglerin bullaları çıkarıldı. Bullalardan hazırlanan spesmenler %10'luk formaldehit solüsyonuna konularak histopatolojik inceleme için ayrıldı.

2.3. Histopatolojik Ve İmmünohistokimyasal İnceleme

Çalışmanın histopatolojik hazırlık ve değerlendirilmesi Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda aynı patalog tarafından yapıldı.

Formol fiksasyonu sonrası, dekalsifikasyon amacıyla formik asitte tutulan spesmenler mikroskopik görüş altında manibrium malleiye dik ve miringotomi

alanından geçecek şekilde ikiye ayrıldı. İki parça kesit yüzü üzerine yatırılarak parafin bloklar hazırlandı. Alınan 5 mikrometre kalınlığındaki kesitler Hematoksilen-Eozin (HE), Mason-Trikrom (MT), Ki-67, kollajen-IV ve CD-34 histopatolojik ve immünohistokimyasal boyalarla boyandı. İmmünohistokimyasal boyamalar otomatik bir cihazla (Benchmark-XT, Ventana Medical Systems, California, ABD) yapıldı.

Hematoksilen-Eozin ile boyalı kesitler, TM total kalınlığının ölçümü için ışık mikroskobu (Olympus BX51, Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) ile incelendi ve elde edilen görüntüler bir kamera ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 8).Kullanılan büyütmeye göre kalibre edilerek, timpanik membran kalınlıkları mikrometre cinsinden 10 alanda ölçüldü ve bu ölçümlerin ortalamaları TM kalınlığı olarak kabul edildi.



Şekil 8. Normal timpanik membran (HEx25)

Mason-Trikrom boyalı kesitlerden elde edilen görüntüler kullanılarak TM lamina propriasındaki sklerotik lezyonların değerlendirilmesi yapıldı. Bulgular 0-2 puan arasında bir değer verilerek semikantitatif olarak skorlandı. (Skleroz yok: 0, lamina propriada ayrı ayrı yerleşmiş seyrek sklerotik lezyon: 1, bir arada bulunan geniş sklerotik lezyon: 2).

Ki-67 boyalı kesitlerden elde edilen görüntüler kullanılarak TM lamina propriasında gözlenen inflamasyon 0-3 puan arasında bir değer verilerek

semikantitatif olarak skorlandı. (İnflamasyon yok: 0, hafif inflamasyon: 1, orta derecede inflamasyon: 2, şiddetli inflamasyon: 3).

Kollajen-IVboyalı kesitlerden elde edilen görüntüler kullanılarak TM lamina propriasında gözlenen kollajen artışı 0-3 puan arasında bir değer verilerek semikantitatif olarak skorlandı. (Kollajen artışı yok: 0, hafif kollajen artışı: 1, orta kollajen artışı: 2, şiddetli kollajen artışı: 3).

2.4. İstatistiksel Analiz

Denekler için saptanan histopatolojik ve immünohistokimyasal verilerin, SPSS 11.5 paket programı (SPSS Inc, ABD) kullanılarak veri tabanı oluşturulmuş ve istatistiksel değerlendirilmesi yapılmıştır. Araştırma grubundaki her bir denek grubunun yedi ve toplam örneklem boyutunun 28 vakadan oluşması nedeni ile değişkenler normal dağılıma uymamış, bu nedenle istatistiksel analizlerde non-parametrik testler kullanılmıştır. Otomikroskopik miringoskleroz, kalınlık, lamina propriada inflamasyon, skleroz ve kollajen birikiminin tüm gruplar içinde karşılaştırılmasında herhangi iki grup arasındaki farkın değerlendirilmesinde Kruskal WallisTesti kullanılmıştır. Kruskal Wallis Testinde istatistiksel olarak anlamlı olan parametrenin hangi ikili grup arasındaki farktan kaynaklandığının değerlendirilmesinde non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Değerlendirmelerde $p<0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

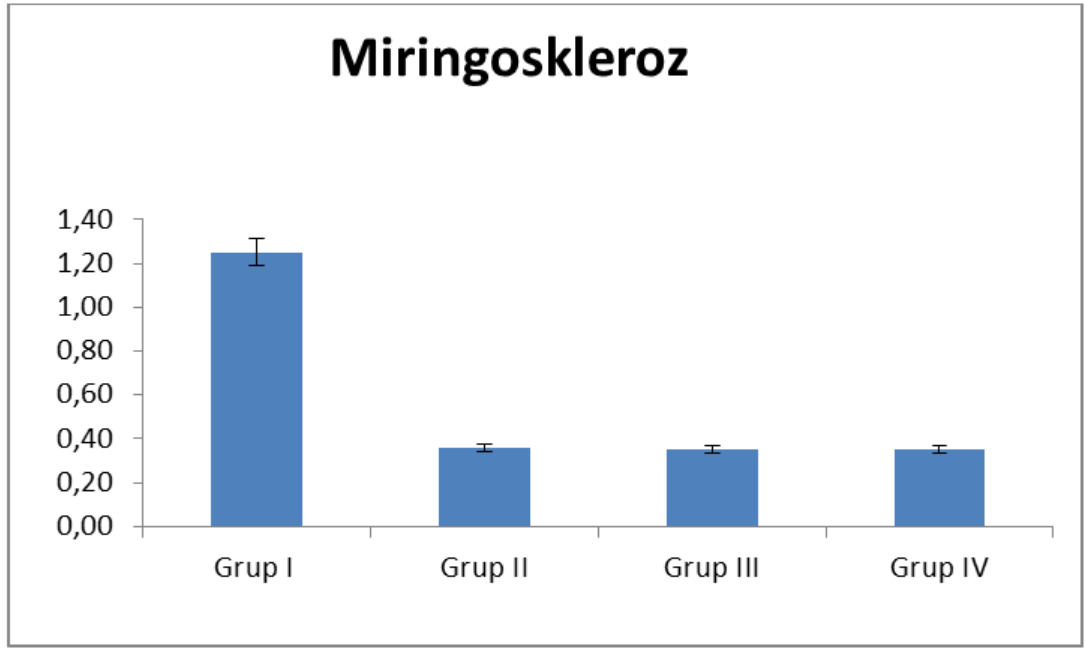
3. BULGULAR

Bu çalışma dört grup (I-IV) üzerinde yapılmıştır. Her bir grupta 7 guinea pig olup çalışmaya 28 guinea pig ve bunların 56 timpanik membranı alınmıştır. Miringotomiden 2 gün sonra grup I'de; 3 gün sonra grup II'de birer guinea pig ölmüş ve grup II'deki bir guinea pigde de orta kulak enfeksiyonu gelişmiştir. Bu nedenle 6 TM çalışma dışı bırakılmış ve çalışmaya 26 guinea pig ve 51 TM ile devam edilmiştir. Hazırlanan spesmen kesitleri CD-34 ile boyanmadığından bu boyama tekniği de çalışmadan çıkarılmıştır.

Otomikroskopik olarak miringoskleroza bakılarak miringoskleroz varlığı değerlendirilmiştir (Şekil 7). Kontrol grubunda sekiz TM'de miringosklerotik lezyon görülmüştür. İki tanesinde + (1), beş tanesinde ++ (2) ve bir tanesinde +++ (3) idi. Grup II'de dört, grup III'de beş ve grup IV'de beş tanesinde miringosklerotik lezyon görülmüş olup hepsi + (1) idi.

Kontrol grubu, grup II, grup III ve grup IV'ün ortalama miringoskleroz skorları sırasıyla 1.25 ± 1.05 , 0.36 ± 0.50 , 0.35 ± 0.49 ve 0.35 ± 0.49 olarak bulunmuştur (Şekil 9). Gruplar arasında miringoskleroz bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0.05$) (Tablo 1). Bu farklılığın hangi ikili gruplar arasından kaynaklandığına bakıldığında grup I ile II, III ve IV arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p < 0.05$). Grup I'deki miringoskleroz; grup II, grup III ve grup IV'e göre daha fazla görülmüştür. Grup II-III, grup II-IV, grup III-IV arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 1).

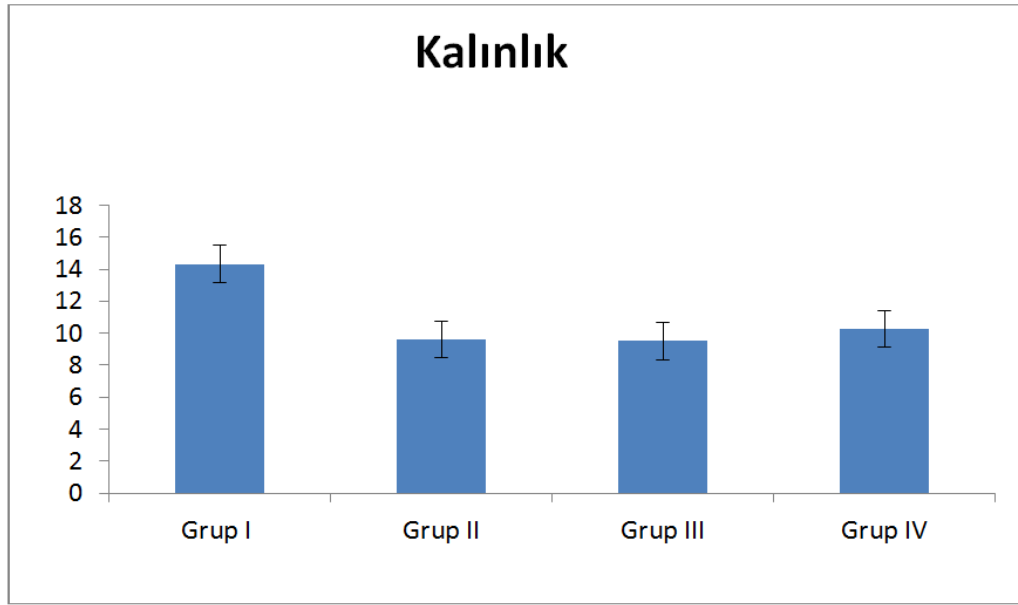
Hematoksilen-Eozin ile boyalı kesitlerde TM kalınlığı ölçülmüştür (Şekil 10). Kontrol grubu, grup II, grup III ve grup IV'ün ortalama TM kalınlıkları sırasıyla 14.33 ± 4.59 , 09.63 ± 2.15 , 09.50 ± 1.60 ve 10.28 ± 2.49 olarak bulunmuştur (Şekil 11). Gruplar arasında TM kalınlığı bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0.05$). Bu farklılığın hangi ikili gruplar arasından kaynaklandığına bakıldığında grup I ile II, III ve IV arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p < 0.05$). Grup I'in TM kalınlığı bakımından grup II, grup III ve grup IV'e göre daha kalın olduğu görülmüştür. Grup II-III, grup II-IV, grup III-IV arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 1).



Şekil 9. Miringosklerozun tüm gruplara göre dağılımı



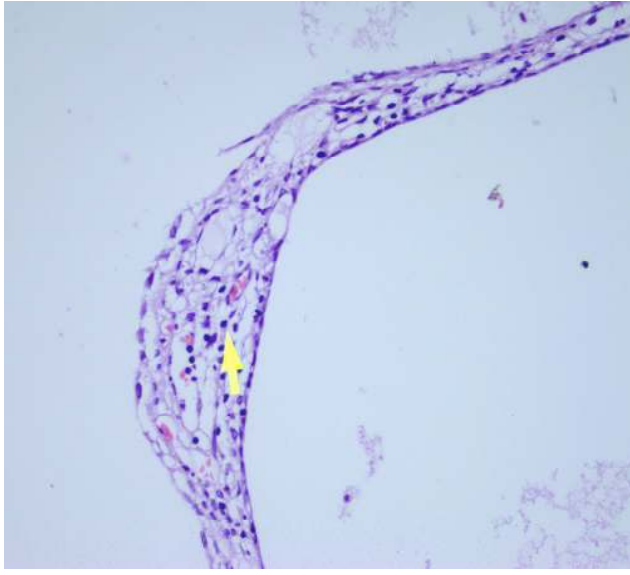
Şekil 10. Timpanik membranda kalınlaşma (HEx40)



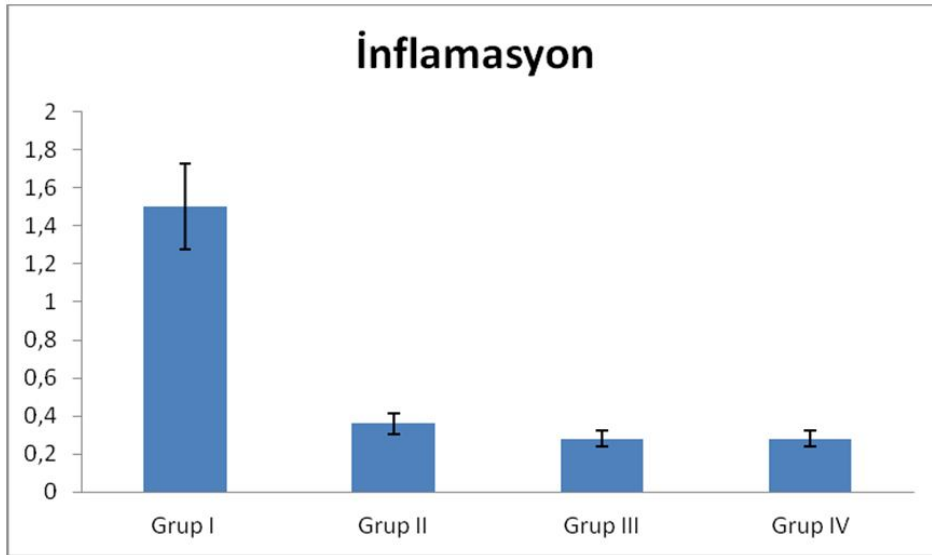
Şekil 11. Timpanik membran ortalama kalınlığının tüm gruplara göre dağılımı

Preparatlar inflamasyon açısından değerlendirilmiştir (Şekil 12). Kontrol grubunda 12 timpanik membranın dört tanesinde inflamasyon yok iken altı tanesinde orta ve iki tanesinde şiddetli inflamasyon görülmüştür. Grup II’de 11 timpanik membranın yedi tanesinde inflamasyon görülmezken dört tanesinde hafif derecede inflamasyon görülmüştür. Grup III’de 14 timpanik membranın on tanesinde inflamasyon yok iken dört tanesinde hafif inflamasyon görülmüştür. Grup IV’de ise 14 timpanik membranın dokuzunda inflamasyon yok iken beş tanesinde hafif inflamasyon görülmüştür.

Kontrol grubu, grup II, grup III ve grup IV’ün ortalama inflamasyon skorları sırasıyla 1.50 ± 1.16 , 0.36 ± 0.50 , 0.28 ± 0.46 ve 0.35 ± 0.49 olarak bulunmuştur (Şekil 13). Gruplar arasında inflamasyon bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0.05$). Bu farklılığın hangi ikili gruplar arasından kaynaklandığına bakıldığında grup I ile II, III ve IV arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p < 0.05$). İnflamasyonun grup II, grup III ve grup IV’de grup I’e göre daha az olduğu görülmüştür. Grup II-III, grup II-IV ve grup III-IV arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 1).



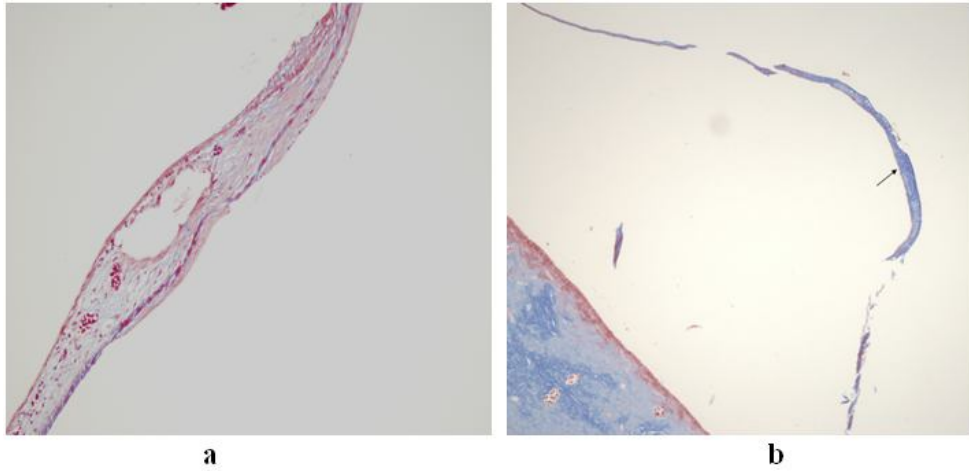
Şekil 12. Timpanik membranda inflamasyon (MTx400)



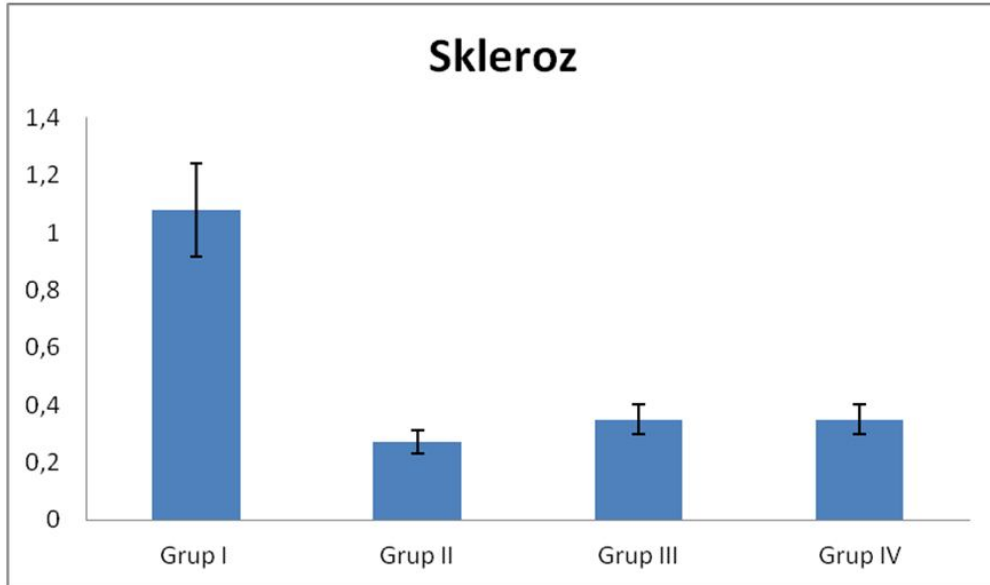
Şekil 13. İnflamasyonun tüm gruplara göre dağılımı

Timpanik membranda sklerozu değerlendirebilmek için preparatlar incelenmiştir (Şekil 14). Kontrol grubunun dört tanesinde skleroz yok iken sekizinde skleroz görülmüştür. Bunların üç tanesinde lamina propriada ayrı ayrı yerleşmiş seyrek sklerotik lezyon, beşinde bir arada bulunan geniş sklerotik lezyon görülmüştür. Grup II'nin sekiz tanesinde skleroz yok iken üçünde lamina propriada ayrı ayrı yerleşmiş seyrek sklerotik lezyon görülmüştür. Grup III'ün dokuzunda skleroz yok iken beş tanesinde lamina propriada ayrı ayrı yerleşmiş seyrek sklerotik lezyon görülmüştür. Grup IV'ün dokuz skleroz yok iken beşinde lamina propriada ayrı ayrı yerleşmiş seyrek sklerotik lezyon görülmüştür.

Kontrol grubu, grup II, grup III ve grup IV'ün ortalama skleroz skorları sırasıyla 1.08 ± 0.90 , 0.27 ± 0.46 , 0.35 ± 0.49 ve 0.35 ± 0.49 olarak bulunmuştur (Şekil 15). Gruplar arasında skleroz bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0.05$). Bu farklılığın hangi ikili gruplar arasından kaynaklandığına bakıldığında grup I ile II, III ve IV arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p < 0.05$). Sklerozun grup II, grup III ve grup IV'de grup I'e göre daha az olduğu görülmüştür. Grup II-III, grup II-IV ve grup III-IV arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$)(Tablo 1).



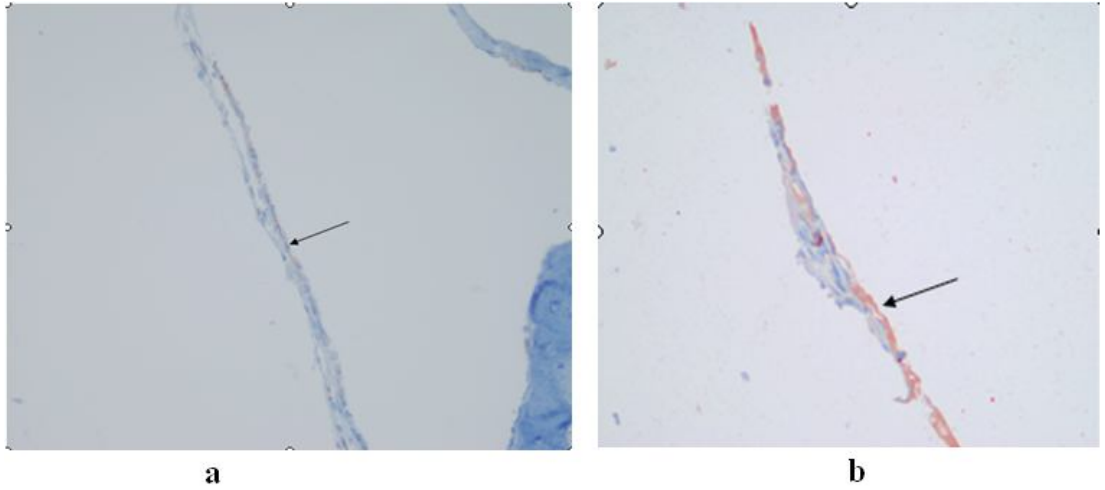
Şekil 14. Timpanik membranda skleroz (a: HEx200, b: MTx100)



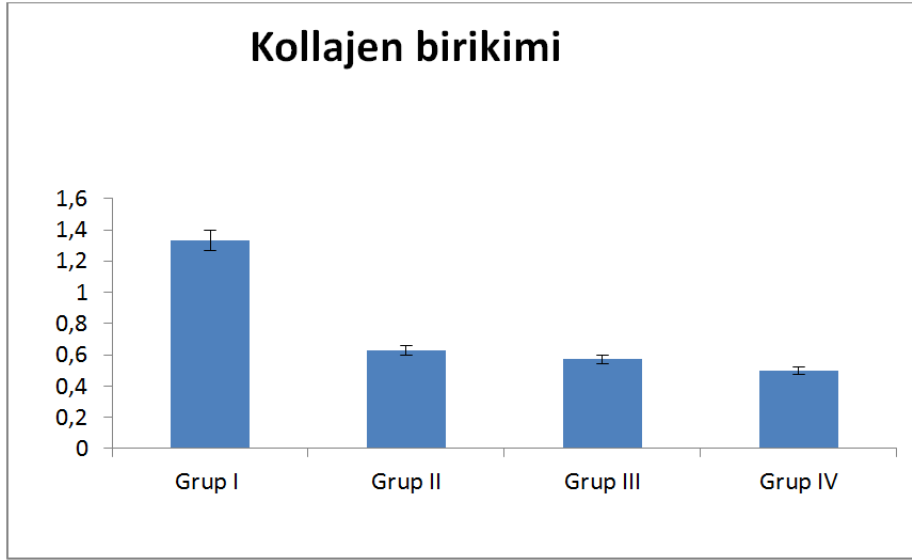
Şekil 15. Lamina propriadaki sklerozun tüm gruplara göre dağılımı

Timpanik membranda kollajen-IV birikimini değerlendirebilmek için preparatlar incelenmiştir (şekil 16). Kontrol grubundaki tüm preparatlarda kollajen-IV artışı varken bunların dokuz tanesinde hafif, iki tanesinde orta ve bir tanesinde şiddetli kollajen-IV artışı görülmüştür. Grup II'nin dört tanesinde kollajen-IV artışı yok iken yedi tanesinde hafif artış görülmüştür. Grup III'n yedi tanesinde kollajen-IV artışı yok iken yedi tanesinde görülmüştür. Bunların altı tanesinde hafif ve bir tanesinde orta kollajen-IV artışı görülmüştür. Grup IV'n yedi tanesinde kollajen-IV artışı yok iken yedi tanesinde hafif kollajen-IV artışı görülmüştür.

Kontrol grubu, grup II, grup III ve grup IV'n kollajen-IV skorları sırasıyla 1.33 ± 0.65 , 0.63 ± 0.50 , 0.57 ± 0.64 ve 0.50 ± 0.51 olarak bulunmuştur (şekil 17). Gruplar arasında kollajen-IV bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0.05$). Bu farklılığın hangi ikili gruplar arasından kaynaklandığına bakıldığında grup I ile II, III ve IV arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p < 0.05$). Grup I'de, kollajen-IV birikiminin grup II, grup III ve grup IV'e göre daha fazla olduğu görülmüştür. Grup II-III, grup II-IV, grup III-IV arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$)(Tablo 1).



şekil 16. Timpanik membranda kollajen artışı (Kollajen-IVx100 a: hafif, b: orta)



Şekil 17. Lamina propriadaki kollajen birikiminin tüm gruplara göre dağılımı

Tablo 1. Tüm grupların istatistiksel analiz sonuçları

İncelenen Özellikler						
Gruplar	n	Miringoskleroz	Kalınlık	İnflamasyon	Skleroz	Kollajen
I	12	1.25±1.05 ^a	14.33±4.59 ^a	1.50±1.16 ^a	1.08±0.90 ^a	1.33±0.65 ^a
II	11	0.36±0.50 ^b	09.63±2.15 ^b	0.36±0.50 ^b	0.27±0.46 ^b	0.63±0.50 ^b
III	14	0.35±0.49 ^b	09.50±1.60 ^b	0.28±0.46 ^b	0.35±0.49 ^b	0.57±0.64 ^b
IV	14	0.35±0.49 ^b	10.28±2.49 ^b	0.35±0.49 ^b	0.35±0.49 ^b	0.50±0.51 ^b
p		*	*	*	*	*

* : p<0.05

- : p>0.05

a,b: Aynı sütundaki farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).

n: Timpanik memebran sayısı

4. TARTIŞMA

Miringoskleroz, otoskopik muayenede timpanik membran üzerinde yerleşmiş değişik şekil ve boyutlardaki beyaz kalsifiye plaklar şeklinde görülür. Histolojik olarak TM'nin laminapropriasındaki kollajen yapının hiyalinizasyonu ve kalsifikasyonu sonucu oluşur (1-6). Düzensiz kollajen lifleleri arasına kalsiyum fosfatın mineralize olup çökmesi ile kalsifikasyon meydana gelir (8-12). Bu distrofik kalsifikasyona örnektir. Geri dönüşümsüz ve patolojiktir (65).

Sklerozun orta kulak, kemikçik zincir, mastoid hücreler ve iç kulaktan bir veya birkaç bölgeyi tutmasına timpanoskleroz denir. TM'nin büyük bölümü ve kemikçik zincir tutulumunda iletim tipi işitme kaybı; iç kulak yapılarının tutulumunda ise ileri derecede sensörinöral işitme kaybı görülür (12, 66). Yapılan çalışmalarda orta kulak kemikçik zincir tutulumu olan vakaların %50'sinde stapes tutulumu olduğu görülmüştür (67). Sklerotik plakların temizlenmesi kemikçik zincir hareketinin tekrar sağlanabilmesi cerrahi ile mümkündür. Yapılan çalışmalarda cerrahi sonrası hareket kazanan kemikçik zincir etrafında sklerozun tekrar oluştuğu ve kemikçik zincirin hareketlerinde kısıtlılığa neden olduğu görülmüştür (67, 68).

Pirodda ve ark. (69) yaptıkları çalışmada timpanosklerozun aterosklerozun bir analogu olduğu sonucuna varmışlardır. Koç ve ark. (70) ateroskleroz gibi lamina propriada kalsifikasyonla seyreden hastalıkların timpanoskleroz ile olan ultrastrüktürel benzerliklerini histopatolojik incelemelerle ortaya koymuşlardır. Yine Koç ve ark. (71) yaptıkları başka bir çalışmada normal popülasyona oranla ateroskleroz hastalarında görülen timpanosklerozun istatistiksel olarak yüksek oranda anlamlı olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca sklerotik dejenerasyon için genetik yatkınlığında olması gerektiğini belirtmişlerdir. Çiçek ve ark. (72) ise yaptıkları çalışmada ateroskleroz ile timpanoskleroz arasında ilişki olmadığını bulmuşlardır. Ayrıca Selçuk ve ark. (73) ateroskleroz ile miringoskleroz arasında genetik yatkınlık ve endoteleyal-epitelyal hasar oluşumunda patolojik benzerlik olmadığını göstermişlerdir. Bu konuda yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Miringosklerozun oluşum mekanizmasını açıklamaya yönelik çeşitli hipotezler öne sürülmüştür. Tos ve ark. (74) normal titreşen TM'de miringoskleroz olmayacağını, ancak ventilasyon tüpü takılması gibi TM hareketini azaltan olayların

kollajen tabakada hiyalinizasyon ve kalsifikasyonu artıracaklarını savunmuşlardır.Yapılan diğer çalışmalarda parasentez veya VT takılması sırasında oluşan kanamanın miringoskleroz oluşumunu artırdığı savunulmaktadır (75-77). Kanama sonrasında serbest hemoglobinin timpanik membran lamina propriasında birikerek iritan etkisiyle miringoskleroz gelişim sürecini başlattığı düşünülmektedir.Başka çalışmalarda ise inflamatuvar reaksiyonun ve önceden bir antijene karşı duyarlılaşmış organizmanın yeniden antijenle karşılaşması sonucu immünolojik reaksiyonların miringoskleroz gelişimine neden olduğu savunulmaktadır (1, 78).

Miringoskleroz etyolojisine yönelik yapılan tüm bu çalışmaların yanında, miringoskleroz oluşumunda otitler sırasında enflamatuvar hücrelerin ve bakterilerin ürettiği reaktif oksijen türevlerinin önemli bir rolü olduğunu ileri süren birçok çalışma da yer almaktadır (79).Timpanoskleroz ve kolesteatomunenfeksiyon ile ilişkisi hakkında farklı görüşler vardır. Bu birliktelik sık olmayıp değişik serilerde sıklığı %1'den %43'e varan oranlarda bildirilmiştir (80-83). Genel görüş, birlikte olmalarının tesadüfi ve nadir bir durum olmasıdır (80).Karlıdağ ve ark. (12) ise yaptıkları çalışmada kronik otitis medialı hastalarda kolestatomlu olsun veya olmasın timpanoskleroz oluşumunda nitrik oksit, serbest oksijen radikalleri ve katalazın rol oynayabileceğini belirtmişlerdir.

Orta kulak oksijen konsantrasyonu normalde %5-10 arasında iken, miringotomi sonrası %21'lere yükselmesiyle serbest NO ve SOR miktarı artar (79). Hücrelerin hiperoksik koşullarda kalması, iskemi sonrası reperfüze olan dokularda ya da enflamasyon sırasında fagositik hücrelerin (makrofajlar gibi) aktive olması ile büyük miktarlarda süperoksit radikalleri üretilmesi tetiklenir (84, 85). Hiperoksik zedelenmeye neden olan serbest radikallerin başlıcaları oksijenin belirli koşullarda kimyasal indirgenmesi sonucu oluşan çok kısa ömürlü ve güçlü oksidan nitelikli oksijen metabolitleri olan; hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu (O_2^-) ve hidroksil (OH) radikalıdır(79).Hidrojen peroksit önemli bir SOR aracıdır. SOR özellikle bağdokudaki makrofajlar tarafından üretildiğinden en önemli hasar da bu bölgede olmaktadır (6, 7, 11). Mattson ve ark (21) ortakulak enfeksiyonları ve parasentez sırasında oluşan doku hasarı sonrası sklerozun, dokuz saat gibi kısa bir süre içinde oluşabildiğini göstermişlerdir (21). Özel ve ark. (86) lokal olarak

kullanılan H_2O_2 'nin hem yara iyileşmesini geciktirdiği hem de miringoskleroz gelişimini artırdığını bulmuşlardır.

Oksidan moleküller organizmada sürekli bir oluşum ve antioksidanlar tarafından sürekli bir etkisizleştirilme süreci içindedirler. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki bu hassas denge korunamadığı takdirde hücreler hasar görmekte ve birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır (87). Dokuda geriye dönüşümsüz hasarı önlemek ya da onarıcı mekanizmalar tarafından onarılabilecek düzeyde tutmak, SOR veya reaktif moleküllerin kontrol altında tutulmasına bağlıdır. Böylece ortakulak ve TM fibröz tabaka hasarı engellenebilir. Spratley ve ark. (4) bir antioksidan ajan olan askorbik asitin topikal uygulanmasının ratların perfore kulak zarlarında miringoskleroz gelişimini azalttığını göstermişlerdir. Yapılan başka çalışmalarda da perfore kulak zarına serbest oksijen radikali temizleyicileri uygulanarak miringosklerozun azaltılabileceği gösterilmiştir (7, 9).

Görür ve ark. (88) miringotomiden sonra miringoskleroz oluşumunun önlenmesi ve azaltılması amacıyla intraperitoneal selenyum kullanmışlardır. Çalışma sonucunda miringosklerozun azaldığını belirtmişlerdir. Yapılan diğer bazı çalışmalarda alfa-tokoferol, erdosteine, deksantenol, N-asetilsistein, Ginkgo biloba ve E vitamini gibi antioksidan maddeler kullanılarak miringosklerozun azaltılabildiği gösterilmiştir (7, 89, 90). Literatürde yapılan çalışmalarda likopenin H_2O_2 ve NO radikallerini inaktive ederek antioksidan olarak görev yapabildiği ve aktif oksijenin etkisini engelleyebildiği görülmüştür (24, 37-39). Tang ve ark. (91) hidrojen peroksit ile endotel hücrelerinde oksidatif stresin geliştirildiği çalışmada hücrelerdeki lipid peroksidasyonu likopen tedavisi istatistiksel olarak önemli düzeyde engelleyebildiği ve endotel hasarını azalttığı göstermişlerdir. Bu özelliği nedeniyle ateroskleroz, kanser, iskemik kalp ve serebrovasküler hastalıkların risklerini azalttığına yönelik çalışmalar yapılmıştır (92-96). Çalışmamızda likopenin, daha önce pek çok konuda antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri gösterilmiş olmasına karşın miringoskleroz oluşumu üzerine hiç çalışılmamış olması tercih nedeni olmuştur.

DeneySEL miringoskleroz oluşturulması ile ilgili literatürde birçok yöntem mevcuttur. Yapılan çalışmalarda insizyonel miringotomi uygulanarak ortama diğer yöntemlerden daha fazla SOR salındığı ve daha fazla miringoskleroz oluşturulduğu görülmüştür (97, 98). Otitis mediyalı kulaklar ile enfeksiyonun olmadığı kulaklara

yapılan insizyonel miringotomi sonrasında oluşan miringoskleroz oranları arasında fark bulunamamıştır (99). Bizim çalışmamızda kolay uygulanabilir bir yöntem olan insizyonel miringotomi kullanılarak daha fazla miringoskleroz oluşturulması hedeflenmiştir ve çalışma sonucunda yeterli miktarda miringoskleroz elde edilmiştir.

Miringosklerozu azaltmada faydalı olacağı düşünülen likopen miringotomiye göre öncesi ve/veya sonrasında kullanılarak II, III ve IV. gruplar oluşturulmuştur. Böylece likopenin profilaktik ya da tedavi şeklinde mi veya her ikisinin de beraber mi verilmesi gerektiği elde edilen sonuçlara göre araştırılmıştır. Grup II’de likopen miringotomi yapıldıktan hemen sonra başlanarak bir hafta süre ile tedavi verilmiştir. Grup III’de likopen miringotomi yapılmadan bir hafta önce profilaktik olarak başlanmış ve miringotomiye kadar verilmiş ve miringotomi yapıldıktan sonra da bir hafta kadar da devam edilerek tedavi verilmiştir. Grup IV’de profilaksi için miringotomiden bir hafta önce likopen başlanmış ve miringotomiden sonra verilmemiştir. Sonuçlar dört grup arasında ayrı ayrı karşılaştırılmıştır.

Çalışma bulgularına göre timpanik membran kalınlığının grup II, III ve IV’de kontrol grubuna göre oldukça azaldığı görülmüştür. Grup II, III ve IV’de timpanik membran kalınlığında istatistiksel olarak bir fark olamamasına rağmen grup IV’de grup II ve III’e göre TM’nin biraz daha kalın olduğu görülmüştür. Kalınlaşma en az grup III’de olmuştur. Buna göre likopenin miringotomiden önce profilaktik başlanması ve miringotomi sonrası tedaviye devam edilmesinin kalınlaşmayı daha fazla azalttığı kanısına varılmıştır. Miringotomiden sonra kalınlaşmayan timpanik membranın fonksiyonu da bozulmamış olacaktır.

Lamina propriadaki inflamasyonun, grup II, III ve IV’de kontrol grubuna göre oldukça azaldığı görülmüştür. İnflamasyon likopenin antiinflamatuvar etkisi ile azalmıştır. Grup II, III ve IV’de istatistiksel olarak bir fark olamamasına rağmen grup II’de grup III ve IV’e göre inflamasyonun daha fazla olduğu görülmüştür. En az inflamasyon grup III’de olmuştur. Buna göre likopenin miringotomiden önce profilaktik başlanması ve miringotomi sonrası tedaviye devam edilmesi lamina propriada inflamasyonu daha fazla azaltmış, inflamatuvar hücreler olay yerinde yeterli sayıda olamadığından patolojik süreç de baskılanmıştır.

Lamina propriadaki skleroz değerlendirildiğinde grup II, III ve IV’de kontrol grubuna göre oldukça azaldığı görülmüştür. Grup II, III ve IV’de skleroz daha az

sayıda timpanik membranda görülmüş olup görülenlerde de daha ayrı ayrı ve seyrek yerleşim göstermişlerdir. Bu üç grup arasında istatistiksel olarak bir fark olamamasına rağmen grup III ve IV’de aynı oranda skleroz mevcut olup grup II’ye göre sklerozun daha fazla olduğu görülmüştür. Skleroz en az grup II’de oluşmuştur. Bu bulgulara göre likopenin miringotomiden sonra verilmesi lamina propriada sklerozun oluşumunu azaltmıştır.

Timpanik membran lamina propriasında kollajen-IV birikimi değerlendirildiğinde grup II, III ve IV’de kontrol grubuna göre kollajen-IV birikiminin oldukça azaldığı görülmüştür. Grup II, III ve IV’de istatistiksel olarak bir fark olamamasına rağmen grup II’de grup III ve IV’e göre kollajen-IV daha fazla miktarda birikmiştir. Kollajen-IV birikimi skorları grup III ve IV’de birbirine yakın olmakla beraber grup IV’de en azdır. Buna göre likopenin profilaktik olarak verilmesinin kollajen-IV sentezini daha çok baskılanmış olabileceği söylenebilir.

Doğan ve ark. (100) miringotomiden sonra antioksidan niteliğindeki indüklenebilir nitrik oksit sentetaz enzim inhibitörü olan N-nitro L-arginine methyl ester (L-NAME) kullanmışlardır. Kontrol grubu, L-NAME’i topikal ve intraperitoneal uygulanan gruplar arasında miringoskleroz oluşumunu değerlendirmişler ve L-NAME kullanılan gruplarda miringoskleroz, inflamasyon, kalınlık ve sklerozun kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığını görmüşlerdir. L-NAME topikal ile intraperitoneal uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamız sonucu benzer olup ayrıca kollajen-IV birikimine de bakılmıştır ve likopen verilen gruplarda anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur. Bunun nedeni olarak da likopenin SOR oluşumunu azaltarak inflamasyonu baskılaması ve ortama fibroblastların göç edememesi nedeniyle kollajen sentezinin de azalması nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Çalışma sunucunda likopenin miringosklerozu anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir. Vuralkan ve ark. (101) bir antioksidan olan l-karnitin miringoskleroz üzerine etkisini araştırmışlardır. Miringotomi sonrası intraperitoneal, topikal ve her iki yöntemin de beraber kullanıldığı l-karnitin kullanılan gruplar kontrol grubu ile skleroz, fibroblastik proliferasyon, TM kalınlığı ve yeni damar oluşumu açısından değerlendirilmiştir. İntraperitoneal verilen l-karnitin fibroblastik proliferasyon, skleroz ve TM kalınlaşmasını azaltarak miringoskleroz oluşumunu

engellediğini bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda timpanik membran kalınlığı, inflamasyon, skleroz ve kollajen-IV birikiminin grup II, III ve IV’de kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p<0.05$). Bu incelenen özellikler açısından grup II, III ve IV’de istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).

Sonuçlar değerlendirildiğinde çalışmamızda miringotomiden sonra likopen verilen grup (grup II) ile miringotomiden önce ve sonra likopen verilen grup (grup III) ve miringotomiden önce likopen verilen grup (grup IV) karşılaştırıldığında hem otomikroskopik değerlendirme ile elde edilen miringoskleroz hem de histopatolojik olarak değerlendirilen kalınlık, inflamasyon, skleroz ve kollajen-IV birikimi arasında anlamlı fark görülmemesi göz önüne alındığında likopenin miringoskleroz oluşumunu engellemede tedavi edici şekilde verilmesinin yeterli olduğu kanısına varılmıştır.

Likopenin miringoskleroz oluşumu üzerine etkisi ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle, yaptığımız bu çalışma likopen ile miringoskleroz ilişkisini inceleyen tek çalışmadır. Elde edilen sonuçlar, miringosklerozun önlenmesi için farklı ajanlarla yapılan çalışmalardaki benzer sonuçlarla paralel olduğu görülmüştür. Likopenin SOR’u azaltarak diğer dokularda gösterdiği antiinflamatuvar ve antifibrotik davranışını, timpanik membran dokusundaki yara iyileşme sürecinde de sergilediği ortaya konmuştur. Bu etkileriyle guinea pig timpanikmembranında miringoskleroz gelişimini önlediğini göstermiş olduğumuz likopen, miringotomi yapılması ya da ventilasyon tüpü uygulaması sonrası görülebilen miringosklerozun önlenmesinde ve benzer oluşum mekanizmasına sahip timpanosklerozun önlenmesinde iyi bir tedavi alternatifi olabilir. Ancak klinik uygulama bulması için daha ileri ve geniş kapsamlı çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır.

5. KAYNAKLAR

1. Mattsson C, Stierna P, Hellstrom S. Treatment with dexamethasone arrests the development of myringosclerosis after myringotomy. *Am J Otol* 2000; 21: 804-808.
2. Forseni M, Hansson GK, Bagger-Sjöback D, Hultcrantz M. An immunohistochemical study of inducible nitric oxide synthase in the rat middle ear, with reference to tympanosclerosis. *Acta Otolaryngol* 1999; 119: 577-582.
3. Akbaş Y, Pata YS, Görür K, Polat G, Polat A, Ozcan C, Unal M. The effect of L- carnitine on the prevention of experimentally induced myringosclerosis in rats. *Hear Res* 2003; 184: 107-112.
4. Spratley JE, Hellström SO, Mattsson C, Pais-Clemente M. Topical ascorbic acid reduces myringosclerosis in perforated tympanic membranes. A study in rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001; 110: 585-591.
5. Russell JD, Giles JJ. Tympanosclerosis in the rat tympanic membrane: an experimental study. *Laryngoscope* 2002; 112: 1663-1666.
6. Görür K. Timpanoskleroz ve miringosklerozun etiyopatogenezi. *Otoscope* 2004; 4: 125-129.
7. Ozcan C, Görür K, Cinel L, Talas DU. The inhibitory effect of topical Nacetylcysteine application on myringosclerosis in perforated rat tympanic membrane. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002; 63: 179-184.
8. Song JJ, Kwon SK, Cho CG, Park SW. The effect of caffeic acid phenethyl ester on the prevention of experimentally induced myringosclerosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007; 71: 1287-1291.
9. Polat S, Oztürk O, Uneri C, Yüksel M. Determination of reactive oxygen species in myringotomized tympanic membranes: effect of vitamin E treatment. *Laryngoscope* 2004; 114: 720-725.

10. Mattsson C, Hellström S. Inhibition of the development of myringosclerosis by local administration of fenspiride, an anti-inflammatory drug. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1997; 254: 425-429.
11. Mattsson C, Magnuson K, Hellström S. Myringosclerosis caused by increased oxygen concentration in traumatized tympanic membrane. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104: 625-632.
12. Karlıdag T, İlhan N, Kaygusuz I, Keles E, Yalcin S. Comparison of free radicals and antioxidant enzymes in chronic otitis media with and without tympanosclerosis. *Laryngoscope* 2004; 114: 85-89.
13. Güneri EA, Tekin S, Yılmaz O, Özkara E. The effects of hyalunoric acid, epidermal growth factor and mitomycin in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol* 2003; 24: 371-376.
14. Oktay MF, Cüreoglu S, Schachern PA, Paparella MM. Tympanic membrane changes in central tympanic membrane perforations. *Am J Otolaryngol* 2005; 26: 393- 397.
15. Johnson AP, Smallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1990; 109: 406-415.
16. Spratley J, Hellström S, Eriksson PO, Pais-Clemente M. Early structural tympanic membrane reactions to myringotomy: a study in an acute otitis media model. *Acta Otolaryngol* 2002; 122: 479-487.
17. Magnuson K, Hermansson A, Hellström S. Healing of tympanic membrane after myringotomy during streptococcus pneumoniae otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996; 105: 397-404.
18. Wang WQ, Wang ZM, Chi FL. Spontaneous healing of various tympanic membrane perforations in the rat. *Acta Otolaryngol* 2004; 124: 1141-1144.

19. Mondain M, Ryan A. Histological study of the healing of traumatic tympanic membrane perforation after basic fibroblast growth factor application. *Laryngoscope* 1993; 103: 312-318.
20. Hussl B, Lim DJ. Histopathology of tympanosclerosis. In: Lim DJ, editor. *Recent Advances in Otitis Media with Effusion*. St Luio: Mosby; 1984:348-353.
21. Mattsson C, Johansson C, Hellström S. Myringosclerosis develops within 9 hours of myringotomy. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1999; 61: 31-36.
22. Santos PF, Leal MC, Peixoto C, Caldas NS. Otomicroscopic and histologic findings of induced myringosclerosis in rats: a critical study of an experimental model. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)* 2005; 71: 668-674.
23. John EO, Russell PT, Nam BH, Jinn TH, Jung TT. Concentration of nitric oxide metabolites in middle ear effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2001; 60: 55-58.
24. Rao AV, Ray MR, Rao LG. Lycopene. *Adv Food and Nutr Res* 2006; 51: 99-164.
25. Omoni AO, Aluko RE. The anticarcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. *Trend Food Sci* 2005; 16: 344-350.
26. Giovannucci E. A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Exp Biol Med* 2002; 227: 852-859.
27. Aust O, Ale-Agha N, Zhang L, Wollersen H, Sies H, Stahl W. Lycopene oxidation product enhances gap junction communication. *Food Chem Toxicol* 2003; 41: 1399-1407.
28. Heber D. Mechanisms of action of lycopene: Overview. *Lycopene and the prevention of chronic diseases*. Rao AV, Heber D (editors) Scotland: Caledonian Science Press 2002; 1: 41-42.

29. Wertz K, Siler U, Goralczyk R. Lycopene: Modes of action to promote prostate health. *Arch Biochem Biophys* 2004; 430: 127–134.
30. Chew B, Park J. Carotenoid action on immune response. *J Nutr* 2004; 134: 257–261.
31. Heber D, Lu Q-L. Overview of mechanisms of action of lycopene. *Exp Biol Med* 2002; 227: 920–923.
32. Kim GY, Kim JH, Ahn SC, Lee HJ, Moom DO, Lee CM, Park YM. Lycopene suppresses the lipopolysaccharide-induced phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells through inhibition of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B. *Immunology* 2004; 113: 203–211.
33. Shi J, Le Maguer M. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit Rev Biotechnol* 2000; 20:293-334.
34. Agarwal S, Rao VA. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ* 2000; 163: 739-744.
35. Paiva S, Ressel R. Beta carotene and other carotenoids as antioxidants. *J Am Coll Nutr* 1999; 18: 426-433.
36. Cohen L. A review of animal model studies of tomato carotenoids, lycopene, and cancer chemoprevention. *Exp Biol Med* 2002; 227: 864-868.
37. Shi J, Mazza G, Maguer M. Lycopene from tomatoes. *Functional foods. Biochemical Proc Asp* 2002; 2: 136-152.
38. Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett* 1996; 384: 240-246.
39. Bohm F, Tinkler JH, Truscott TG. Carotenoids protect against cell membrane damage by nitrogen dioxide radical. *Nat Med* 1995; 1: 98-99.

40. Edward AM, Duckworth MD, Fernando E, Silva MD, James P, Chandler MD, et al. Temporal bone dissection for neurosurgery residents: identifying the essential concepts and fundamental techniques for success. *Surgical Neurology* 2008; 69: 93-98.
41. Özbilen S, İleri F, Uslu S. Temporal Kemik Cerrahi Girişim Atlası. Ankara: Evren Yayıncılık, 2003: 27–48.
42. Akyıldız AN. Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi. Cilt 1. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 1998: 22–62
43. Katsuta T, Rhoton AL, Matsushima T. The jugular foramen: microsurgical anatomy and operative approaches. *Neurosurgery* 1997; 41: 149-202.
44. Duckert LG. Anatomy of the skull base, temporal bone, external ear and middle ear. Cummings CW, Schuller DE, Fredrickson JM (eds). *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. 3 ed. St. Louis: Mosby-Year Book, 1998: 2533–2546
45. Yamashita T. Histology of the tympanic perforation and the replacement membrane. *Acta Otolaryngol* 1985; 100: 66–71
46. Öztürk R. Guinea Pig Kulak Cerrahi Anatomisi. Uzmanlık Tezi, İstanbul: Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi. KBB Anabilim Dalı, 2003.
47. Göksu N, Hazıroğlu R, Kemaloglu Y, Karademir N, Bayramoglu I, Akyıldız N. Anatomy of the guinea pig temporal bone. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992; 101: 699-704.
48. Kayhan FT, Alöz Z. A histologic study on temporal bone of guinea pigs. *Kulak Burun Boğaz İhtisas Dergisi*, 2003; 10: 51-57
49. Somers T, Goovaerts G, Schelfhout L. Growth factors in tympanic membrane perforation. *Am J Otol* 1998; 19: 428-434

50. Yamaguchi Y, Yoshikawa K. Cutaneous wound healing: an update. *J Dermatol* 2001; 28: 521-534.
51. Hellstrom S, Laurent C. Hyaluronan and healing of tympanic membrane perforations. An experimental study. *Acta Otolaryngol Suppl* 1987; 442: 54-61.
52. Yeo SW, Kim SW, Suh BD, Cho SH. Effects of platelet-derived growth factor-AA on the healing process of tympanic membrane perforation. *Am J Otolaryngol* 2000; 2: 153–160
53. Santos PF, Leal MC, Peixoto C, Caldas NS, Rosas ST. Otomicroscopic and histologic findings of induced myringosclerosis in rats: a critical study of an experimental model. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)* 2005; 71: 668-674.
54. Halliwell B, Gutteridge John MC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition. New York: Oxford University Press, 2001: 22-24.
55. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481-493.
56. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
57. Nakazawa H. Pathological aspects of active oxygen/free radicals. *Jap J Physiol* 1996; 46: 15-32.
58. Parker RS. Absorption, metabolism and transport of carotenoids. *Faseb J* 1996;10: 542–551.
59. Rao AV, Agarwal S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. *Nutr Res* 1999; 19: 305-323.
60. Bramley PM. Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry* 2000; 54: 233- 236.

61. Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ* 2000; 163: 739-744.
62. Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett* 1996; 384: 240-246.
63. Shixian Q, Dai Y, Kakuda Y, Shi J, Mittal G, Yeung D, Jiang Y. Synergistic antioxidative effects of lycopene with other bioactive compounds. *Food Rev Int* 2005; 21: 295-311.
64. Bohm F, Tinkler JH, Truscott TG. Carotenoids protect against cell membrane damage by nitrogen dioxide radical. *Nat Med* 1995; 1: 98-99.
65. Doner F, Yariktas M, Dogru H, Uzun H, Aydin S, Delibas N. The biochemical analysis of tympanosclerotic plaques. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 128: 742-745.
66. Akyıldız N. Timpanoskleroz. Akyıldız N (ed). *Kulak hastalıkları ve Mikrocerrahisi 1*. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 1998: 461-472.
67. Safak MA, Celik H, Bayiz U, Ceylan K, Ozdek A, Ozeri C. Stapedectomy in tympanosclerosis. *Int Congress Series* 2003; 1240; 115-119.
68. Kamal SA. Surgery of tympanosclerosis. *J Laryngol Otol* 1997; 111: 917-923.
69. Pirodda A, Ferri GG, Bruzzi C, Marini M, Faggioli G. Possible relationship between tympanosclerosis and atherosclerosis. *Acta Otolaryngol* 2004; 124: 574-576.
70. Koc A, Uneri C. Ultrastructural comparison between tympanosclerosis and atherosclerosis. *Türk Otolarengoloji Arşivi* 2005; 43: 137-144.
71. Koc A, Uneri C. Sex distribution in children with tympanosclerosis after insertion of a tympanostomy tube. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001; 258: 16-19.

72. Cicek D, Vayisoglu Y, Görür K, Camsarı A, Ozcan IT, Akcay B, Aksoy KA. Is there any relation between coronary atherosclerosis and tympanosclerosis? *Anadolu Kardiyol Derg* 2010; 10: 121-125.
73. Selcuk A, Ozlü F, Akdogan O, Ozbek C, Dere H. Is there a relationship between myringosclerosis and atherosclerosis? *B-ENT* 2007; 3: 127-130.
74. Tos M, Bonding P, Poulsen G. Tympanosclerosis of the drum in secretory otitis after insertion of grommets. *J Laryngol Otol* 1983; 97: 489-496.
75. Dawes PJD, Bingham BJ, Rhys R, Griffiths MV. Aspirating middle ear effusions when inserting ventilation tubes: does it influence post-operative otorrhoea, tube obstruction or the development of tympanosclerosis? *Clin Otolaryngol* 1991; 16: 457-461.
76. Parker AJ, Maw AR, Powell JE. Intra-tympanic membrane bleeding after grommet insertion and tympanosclerosis. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1990; 15: 203-207.
77. McRae D, Gatland DJ, Youngs R, Cook J. Aspiration of middle ear effusions prior to grommet insertion an etiological factor in tympanosclerosis. *J Otolaryngol* 1989; 18: 229-231.
78. Schiff M, Poliquin JF, Catanzaro A, Ryan AF. Tympanosclerosis. A theory of pathogenesis. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1980; 89: 1-16.
79. Mattsson C, Carlsson L, Marklund SL, Hellström S. Myringotomized mice develop myringosclerosis in the pars flaccida and not in the pars tensa. *Laryngoscope* 1997; 107: 200-205.
80. Gibb AG, Pang YT. Current considerations in the etiology and diagnosis of tympanosclerosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1994; 251: 439-451.
81. Pulec JL, Deguine C. Dry central perforation with tympanosclerosis and cholesteatoma. *Ear Nose Throat J* 2002; 81: 488-490.

82. Asiri S, Hasham A, al Anazy F, Zakzouk S, Banjar A. Tympanosclerosis: review of literature and incidence among patients with middle-ear infection. *J Laryngol Otol* 1999;113: 1076-1080.
83. Deguine C, Pulec JL. Attic cholesteatoma and tympanosclerosis. *Ear Nose Throat J* 1997;76: 364-369.
84. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.
85. Farber J, Kyle EM, Coleman JB. Biology of disease. Mechanism of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest* 1990; 62: 670-679.
86. Özel B, Yasan H, Çiriş M, Doğru H, Çandır Ö. Miringoskleroz gelişimi ve kulak zarı perforasyonu iyileşmesi üzerine farklı ajanların etkileri. *KBB-Forum* 2005; 4: 123-127.
87. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* 1998; 11: 342-346.
88. Görür K, Ozcan C, Polat A, Unal M, Tamer L, Cinel I. The anti-oxidant and anti-apoptotic activities of selenium in the prevention of myringosclerosis in rats. *J Laryngol Otol* 2002; 116: 426-429.
89. Kazıkdas KC, Uguz MZ, Erbil G, Tugyan K, Yilmaz O, Güneli E, Altun Z. The anti-oxidant effect of alpha-tocopherol in the prevention of experimentally induced myringosclerosis. *Otol Neurotol* 2006; 27: 882-886.
90. Kaptan ZK, Emir H, Göcmen H, Uzunkulaoglu H, Karakas A, Senes M, Samim E. Ginkgo biloba, a free oxygen radical scavenger, affects inflammatory mediators to diminish the occurrence of experimental myringosclerosis. *Acta Otolaryngol* 2009; 129: 826-831.
91. Tang X, Yang X, Peng Y, Lin J. Protective effects of lycopene against H₂O₂-induced oxidative injury and apoptosis in human endothelial cells. *Cardiovasc Drugs Ther* 200; 23: 439-448.

92. Dorgan JF, Sowell A, Swanson CA, Potischman N, Miller R, Schussler N, Stephenson HE Jr: Relationship of serum carotenoids, retinol, a-tocopherol, and selenium with breast cancer risk: results from a prospective study in Columbia, Missouri (United States). *Cancer Causes Control* 1998; 9: 89–97.
93. VanEewyck J, Davis FG, Bowen PE: Dietary and serum carotenoids and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 1991; 48: 34–38.
94. Helzlsouer KJ, Comstock GW, Morris JS: Selenium, lycopene, a-tocopherol, b-carotene, retinol, and subsequent bladder cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 6144–6148.
95. Parthasarathy S, Steinberg D, Witztum JL: The role of oxidized low-density lipoproteins in pathogenesis of atherosclerosis. *Ann Rev Med* 1992; 43:219–225.
96. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Cashin-Hemphill L, Sevanian A, Johnson R, Azen SP: Serial coronary angiographic evidence that antioxidant vitamin intake reduces progression of coronary artery atherosclerosis. *JAMA* 1995;273:1849–1854.
97. Sakallı E, Baylancicek S, Yüksel M, Erdurak SC, Dadas B. Levels of reactive oxygen species in rat tympanic membranes after incisional versus radiofrequency myringotomy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013; 77: 792-795.
98. Erdurak SC, Coşkun BU, Sakallı E, Tansuker HD, Turan F, Kaya D. Does the use of radiofrequency myringotomy for insertion of a ventilation tube reduce the incidence of myringosclerosis? *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013 Mar 15. [Epub ahead of print]
99. Mattsson C, Magnuson K, Hellström S. Myringotomy: A prerequisite for the development of myringosclerosis? *Laryngoscope* 1998;108:102-106.

100. Dogan E, Erdag TK, Sarioglu S, Ecevit MC, Ikiz AO, Güneri EA. The preventive effect of N-nitro L-arginine methyl ester in experimentally induced myringosclerosis Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2011; 75: 1035-1039.
101. Vuralkan E, Tokgöz SA, Simsek G, Koybasioglu F, Han U, Caliskan M, Besalti O, Akin I. Effect of local use of l-carnitine after myringotomy on myringosclerosis development in rats. J Laryngol Otol 2013; 127: 468-472.

6. ÖZGEÇMİŞ

Elazığ'ın Karakoçan ilçesinde 1981 yılında doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Elazığ'da tamamladım. 1999-2005 yılları arasında Dicle Üniversitesinde tıp eğitimimi aldım. 2005 yılında mecburi hizmetimi Diyarbakır'ın Çüngüş ilçesinde yaptıktan sonra Elazığ'ın Kovancılar ilçesine atandım. 2008 yılı Eylül dönemi Tıpta Uzmanlık Sınavı'nı kazanarak Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları Aaabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. Şu anda bu görevime devam etmekteyim. Evliyim ve bir çocuk annesiyim.