

**T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KULAK BURUN BOĞAZ  
ANABİLİM DALI**

**BURUN SPREYLERİNDE PREZERVATİF OLARAK KULLANILAN  
BENZALKONYUM KLORİD VE POTASYUM SORBAT'IN SIÇAN  
BURUN MUKOZASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. MUSTAFA ERKAN LEBE**

99080

**İZMİR-2000**

# İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
4. BULGULAR.....	25
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇ.....	54
7. ÖZET.....	55
8. KAYNAKLAR.....	59

## GİRİŞ

Solunum yolu hastalıklarında sistemik veya lokal etkili çeşitli preparatlar kullanılmaktadır. Özellikle burun damlaları kulak burun boğaz hekimlerince yaygın olarak kullanılmaktadır. Burun damlaları etken maddenin yanısıra osmoregülatörler, viskoz regülatörler, prezervatifler, solventler, pH regülatörleri gibi (insanlar için zararlı olabilecek) çeşitli ek kimyasal maddeler de ihtiva ederler. Topikal nazal damla kullanan hastalarda bazı yan etkilerin geliştiği rapor edilmiştir. Bu yan etkilere yönelik yapılan araştırmalarda toksik etkilerden özellikle kullanılan prezervatif maddelerin sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. Topikal nazal preparatların hemen hepsi, çok sayıda doz içeren aygıtlar aracılığı ile kullanıldığından bunların kontamine olması, preparatın dayanıklılığını azaltabilir, hatta nazal ve sistemik enfeksiyonlara bile yol açabilir. Bezalkonyum klorid, potasyum sorbat, klorbutol, klorheksol, sodyum metabisulfit ve propil-p-hidroksibenzoat günümüzde kullanılan prezervatiflerden bazılarıdır. Benzalkonyum klorid bunların içinde en sık kullanılanıdır. Bezalkonyum klorid güçlü germisidal etkiye sahip bir kuarterner amonyum elementtir ve bakterilere olduğu kadar memeli hücrelerine de toksik etkisi vardır. Potasyum sorbat genellikle gıda sektöründe kullanılan bir prezervatiftir. Küf ve maya üremesini etkili bir şekilde inhibe eder ve jinekolojide mantar enfeksiyonlarının tedavisinde de kullanılır.

1980 li yılların başından itibaren dekonjestan maddelerin ve prezervatiflerin yol açtığı ileri sürülen medikamentoz rinit vakalarının bildirilmesi ile bu maddelere dikkat çekilmiş ve bu yönde çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Benzalkonyum kloridin solunum yolu epiteli üzerine etkilerini araştırmak üzere pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların bir kısmı benzalkonyum kloridin solunum yolu epiteline zararlı etkileri olduğunu bildirmekle beraber bazı araştırmacılar buna zıt olarak anlamlı bir etkilenmeye rastlamadıklarını rapor etmişlerdir.

Son zamanlarda prezervatif madde olarak tercih edilmeye başlayan potasyum sorbatın burun mukozası üzerine olan etkilerini araştıran kapsamlı bir çalışma mevcut değildir. Cho ve ark.(1) geçtiğimiz aylarda ışık mikroskobu düzeyinde yaptıkları bir araştırmada potasyum sorbatın sıçanların burun epiteli üzerinde benzalkonyum klorid gibi toksik etkileri olduğunu gözlemişlerdir.

Bu çalışmada buruna uygulanan topikal preparatlarda yaygın olarak kullanılan benzalkonyum klorid ve potasyum sorbatın uzun ve kısa süreli uygulamaları sonrasında burun içindeki solunum yolu epiteli üzerinde meydana getirebileceği değişiklikleri ışık mikroskobu, transmisyon elektron mikroskobu ve scanning elektron mikroskobu düzeyinde inceleyerek varsa toksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.





## GENEL BİLGİLER

### NAZAL MUKOZANIN YAPI VE FONKSİYONLARI

Nazal mukoza; nemlendirme, filtrasyon, koruma ve ısı regülasyonu gibi burnun birçok fonksiyonundan sorumlu kompleks bir dokudur. Burun boşluğunun üst kısmını örten 2cm<sup>2</sup>' lik olfaktör bölge dışında burun epiteli, nazal vestibül ve respiratuar bölge olarak ikiye ayrılmaktadır (2).

Burun girişindeki vestibül, keratinize squamöz epitel ile örtülmüştür. Hava burna girdiği zaman vestibüldeki kıllar ilk filtrasyon görevini üstlenirler (2). Respiratuar bölge, silialı veya siliasız yalancı çok katlı kollumnar hücreler, bazal hücreler ve goblet hücreleri ile örtülüdür. Olfaktör mukozanın aksine, solunum mukozası daha belirli bir bazal membran üzerine oturmuştur, bağ dokusu derin, gevşek, küçük kan damarları, venöz pleksus, müköz ve seröz gland yolları, duyu sinirleri ve çoğunlukla lenfositler olmak üzere kan hücreleri içerir. Kan kapillerleri ve venüller ince duvarlıdır ve poroz bazal membrana sahiptir. Bazal hücrelerin goblet hücrelerine veya gerektiğinde silialı hücrelere dönüşme kapasitesi mevcuttur.

Kollumnar hücreler ortalama 25 mikrometre boyundadır. Bu hücreler yüzeyde yaklaşık 7 mikrometredir ve bazal membrana doğru 2-4 mikrometreye incelirler. Her bir kollumnar hücre siliaların bulunup bulunmamasından bağımsız 300-400 adet mikrovilus içerir. Mikroviluslar siliadan ufaktır; 3 mikrometre boya ve 0.1 mikrometre çapa sahiptir ve bazıları dallıdır (3).(Resim 1)



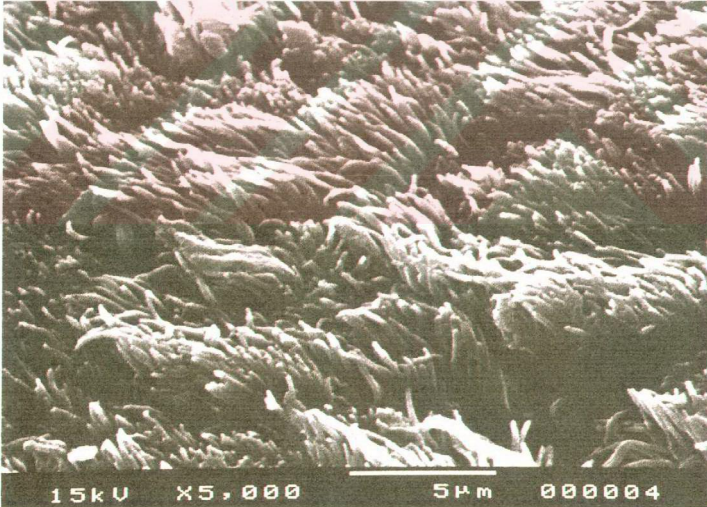
Resim 1 : Nazal mukozada bulunan bir mikrovillusun transmisyon elektron mikroskobu ile elde edilen görüntüsü (x80 000).

Mikroviluslar mikrofilaman öbekleri içerir ve glikaliks karakterinde tüy gibi uzanımlar gösterir. Bu yapıların görevi yüzey alanını genişleterek kurumayı önlemektir (4). Ancak yine de mikrovilusların fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. Silialı hücre sitoplazmaları, tahminen interselluler alış veriş için, bitişik hücre membranları ile karışık interdijitasyon oluştururlar (2,4,5).

Goblet hücreleri bazal membrandan lümeneye doğru uzanan gövdesi ile incelerek gider ve yüzeylerinde mikroviluslar bulunur. Nükleus bazalde yerleşmiştir. Musin içeren salgı granülleri lümeneye doğrudur (2,4,5).

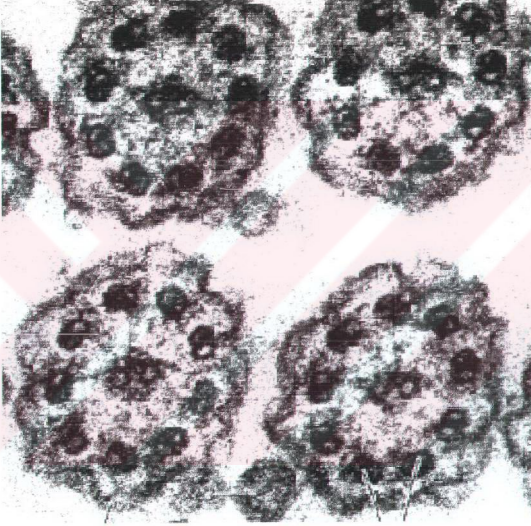
Prizmatik hücreler bazal membrandan dar bir kökten mikroviluslar ile genişlemiş bir yüzeye uzanır. Bu hücreler bitişik hücrelere apikalda sıkı bağlantılar ve hücre membranının interdijitasyonu ile birleşmiştir (4).

Silia bulunan yerlerde her hücre yüzeyinde 50 ila 200 adet silia bulunur. Bu rakam hücrenin burun içindeki yerine ve yaşa bağlı olarak değişkenlik gösterir. İnsanda silialı solunum yolu epiteli, burnun uç bölgesi, posterior orofarengal duvar, larenks ve terminal bronş dalları haricinde bütün solunum yolunu örter(2,4). (Resim 2)



Resim 2: Sağlıklı bir sıçan nazal mukozasının scanning elektron mikroskobu ile elde edilen görüntüsü (x5000).

İnsan siliası hücrenin lüminal yüzünden 6 mikrometre uzunluğunda ve 0.3 mikrometre kalınlığındadır (4,5). Elektron mikroskobu ile incelendiğinde enine kesitte merkezde 2 tek mikrotubulun, çevrede ise 9 çift mikrotubulun dairesel olarak yerleştiği görülür. Bu longitudinal mikrotubul sistemine aksonem adı verilmiştir. Tipik olarak 9+2 kalıbındadır ve hepsi dıştan trilaminer membran ile sarılmıştır (5). ( Resim 3)

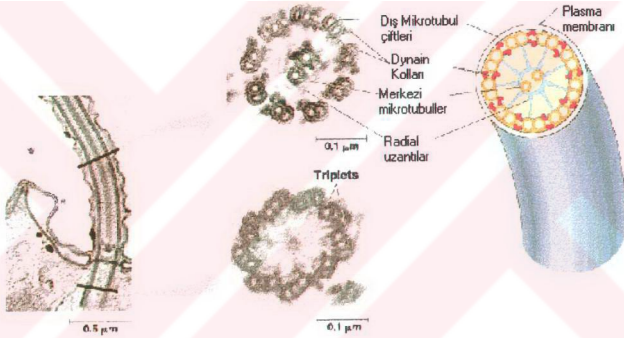


Resim 3: Transmisyon elektron mikroskobunda bir silianın enine kesiti (x45 000).

Santral tubuller birbirinden ayırılır ve santral yaprak ile çevrelenmişlerdir. Periferik tubul çiftleri birbirlerine longitudinal eksen boyunca 86 nm aralıklarla neksin adı verilen elastik protein köprülerle bağlanmışlardır. Ayrıca her bir çevresel mikrotubul çifti 29 nm. luk aralıklar ile merkezdeki santral yaprağa ışınal olarak tutunmuşlardır. Her periferik

mikrotubul çiftini oluşturan subtubuller; subtubul A ve subtubul B olarak isimlendirilmiştir. Subtubul A subtubul B ye göre merkeze daha yakındır. Subtubul A 13 subtubul B 11 filamenden oluşmuştur. Subtubul A tam bir daire şeklindeyken subtubul B yarım yay şeklindedir. Subtubul B nin eksik yüzü subtubul A tarafından kapatılır. Bu noktada A ve B subtubulleri birbirine yapışmıştır. Subtubul A dan komşu tubuler çiftin subtubul B sine 24 nm. luk aralıklarla uzanan ve ATPaz enzim aktivitesine sahip bir çift protein kol mevcuttur ve bunlara dynein kolları adı verilmiştir (5).

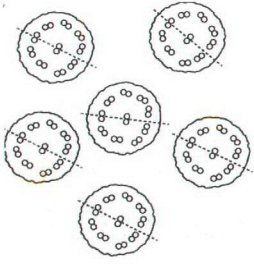
## Silia ve bazal cisminin yapısı



Organizmada sinirsel uyarılar sonucunda ortamda ATP ve Ca iyonları varlığında dynein kolları komşu tubule bağlanır ve tubülün kaymasına ve silianın hareket etmesine yol açar. Silianın hareketi, bir tübülün diğer tübülü kayarak geçmesi ile olur ve böylece eğilmeyi sağlayan bir kırılma gücü yaratılır. Bu iş için enerji dynein kollarındaki adenosin trifosfatının yıkılmasından sağlanır. Eğilme işlemi boyunca kollar çeşitli defalar ayrılır ve bitişir. Silium hareketinin aksı, santral tüp çiftinin planına dik bir hat ile belirlidir.

Silier hareketin kontrolü iyi anlaşılamamıştır, hücreler arasında sinirsel bir bağlantı olduğu düşünülmektedir (2,4).

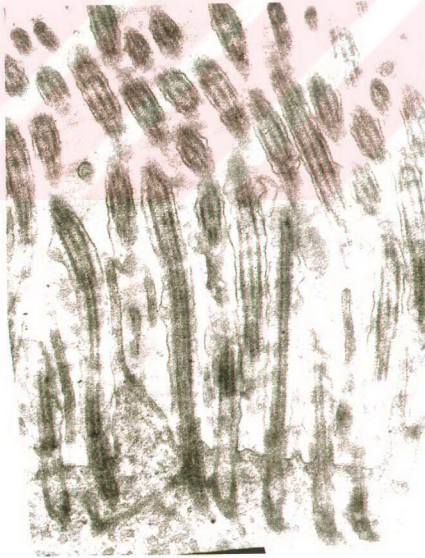




Şekil 1 :Eğilme işlemi boyunca kollar çeşitli defalar ayrılır ve bitişir. Siliannın hareketinin aksı, santral tüp çiftinin planına dik bir hat ile belirlidir.

Siliannın gevşemesi ve doğal pozisyonunu alması pasif bir olaydır ve muhtemelen elastik yapıya sahip neksin proteinleri bu olayda baş rolü oynamaktadır.

Çevresel mikrotubuller yüzeyel stoplazma içinde bazal cisim denen bir yapıya bağlanırlar. Bu yapı ışık mikroskobu ile koyu bir tanecik şeklinde görülür. Oysa bazal cismin elektron mikroskopik görünümü hemen hemen sentriol yapısındadır. Bazal cisimde periferik olarak yerleşmiş 9 adet 3 lü mikrotubuller yapı siliadaki periferik tubul çiftleri olarak devam eder. Siliadaki merkezi mikrotubuller bazal cismin biraz yukarısında aksozom adı verilen yoğun küremsi bir yapı oluşturarak sonlanır (5).



Resim 5: Siliolar ve yüzeyel sitoplazma içinde bağlı oldukları bazal cisimlerin transmisyon elektron mikroskobu ile elde edilen görüntüsü (  $\times 13\ 000$ ).

Silianın ileri geri hareketi silia vurumu olarak adlandırılır. Silialar, hareketlerini senkronize (transvers) ve metakronize (longitudinal) olmak üzere 2 faz da tamamlarlar. Silianın tamamen uzandığı ve uçtaki pençenin üstteki viskoz mukus tabakasına ulaştığı, daha güçlü, ileri doğru ve etkili bir vurumu vardır. Silianın bu longitudinal hareketi darbe ve itici harekettir. Geri dönüş vurumu daha kuvvetsiz ve yavaştır ve silia, kendi üzerinde hafiften yana doğru eğilerek kısalır ve böylece üstteki daha viskoz olan mukus tabakasına ulaşamaz ve bir rezistans ile karşılaşmadan pasif olarak geriye dönüş hareketini tamamlar. Böylece silialar hızlı ve itici yani metakronize, yavaş ve geriye dönüş yani senkronize hareketlerini tamamlamış olurlar (6).

Vurular dakikada 1000 veya daha fazla olmaktadır. Sinir koordinasyonunun özü bilinmemektedir.

Mukosilier sistem; başlıca silli epitel, mukus tabakası ve mukus üreten bezlerden oluşmaktadır (7). Müköz örtü 12-15 mikrometre kalınlığında, koyu, yapışkan bir tabakadır. Müköz ve perisilier olarak iki tabaka içeren bir örtüdür (4). Silianın etrafında kalın, daha az viskoz bir perisilier mukus tabakası ve bunun üzerinde lüminal yüze bakan daha viskoz ve alttaki perisilier sıvı üzerinde hareket eden kalın bir müköz tabaka bulunur (3,4,7,8). Erimeyen partiküller müköz tabakada tutulur ve arkaya doğru özefagusu atılır. Eriyen maddeler perisilier tabakaya ulaşır ve onunla birlikte uzaklaştırılır. Müköz örtünün viskoelastik özellikleri ve kalınlığı hakkında halen elimizde yeterli bilgi mevcut değildir. Sağlıklı insanlarda mukus tabakası hafif asidiktir. Bileşimi yaklaşık olarak %2.5-3 glikoprotein, %1-2 çeşitli tuzlar ve %95 sudur. Protein içeriğinin %70'ini immunglobulinler oluşturur.(2,4) Vestibül haricinde tüm burunda, sinüslerde, orta kulakta, üstaki borusunda, bronş ağacında bulunur. Alveol içinde surfaktan formuna girer. Silianın vurumu içinde erimiş materyal bulunan perisilier tabakayı ve üzerindeki müköz örtüyü ileri atar ve bu özefagusun farengial ucunda yutulur veya ekspektore edilir. Mukus seröz glandlar ve goblet hücrelerinden üretilir.

Ön sinüslerden gelen mukus orta meatusa akar. Sinüslerin lümenleri çevre elementlerine karşı saklıdır ve kontamine olmadığı kabul edilir. Bu zamana dek paranasal sinüslerin tanınmamış bir fonksiyonu bu kontamine olmamış mukusun dilüsyon faktörü olabilir.

Nazal mukosilier klirens burnun sağlıklı kalabilmesi ve koruma fonksiyonu için temel mekanizmadır (3). Mukosilier transport silia aktivitesini etkileyen çeşitli etmenler ile engellenebilir. Normal bir burun yaklaşık 160 cm<sup>2</sup> olan mukozasından dinlenme koşullarında günde 20 ila 40 ml sekresyon yapar (9). Nazal mukus tüm burun mukozasını örten, inhale edilen turbulan hava akımı içindeki partiküllerin çarparak yapıştığı bir örtü

gibidir. 12.5 mikrondan daha geniş olan partiküllerin % 80 i hava akımı farinkse gelene kadar filtre edilmiş olur (9). Mukosilier transport hızının burnun çeşitli yerlerinde farklılık göstermesinin sebebi silia vurum frekansının, silia yoğunluğunun, mukus ve silia kalitesinin ve silia uzunluğunun burnun her yerinde aynı olmamasından kaynaklanır. Mukosilier transport hızı alt konkanın hemen ön kısımlarında saatte 1-2 mm/saat iken arka kısımlarında bu hız 8-10 mm/saate çıkar (9). Genellikle azalmış vurum frekansı nedeniyle olan mukostaz, mukozal penetrasyon ile zararlı elemanların hastalığı başlatmasına izin verebilir.

Çoğu bakteri silier vurumu etkilememesine rağmen B. Pertusis, M. Pneumoniae ve P.Aeruginosa silier vurumu etkiler. Bazı respiratuvar viruslar özellikle influenza virus, rhino virus, adenovirus, herpes simpleks virus ve respiratuvar sinsitial virus, mukosilier transportu bozar. Bunu aksonomal yapıları bozarak veya mukus örtüsünün viskoelastik özelliklerini değiştirerek yaparlar (4,10).

Sinüslerin içindeki debris ve sekresyonun temizlenmesi ancak mukosilier epitel örtünün normal fonksiyon görmesi ile mümkün olmaktadır. Etkili bir mukosilier temizlemenin olmadığı durumlarda, sinüs içinde sekresyon birikmekte ve bakteriyel mikroorganizmaların üremesi kaçınılmaz olmaktadır.

Koruma fonksiyonu sadece siliaların hareketi ile mekanik olarak değil, aynı zamanda Ig A, Ig G ve bazı enzimler ile immünolojik olarak da sağlanmaktadır (7). Mukosilier epitel, burnun bir organı olarak kabul edilmekte ve burnun tüm fonksiyonlarından sorumlu tutulmaktadır. Bu nedenle mümkün olduğu kadar korunması gerekmektedir.

## **KUARTERNER AMONYUM BİLEŞİKLERİ**

Deterjanlar, yüzeyde aktif maddelerdir. Bunlardan anyonik tipte olanlar (sabun ve evlerde temizlik için kullanılan sentetik deterjanlar) ve daha ziyade ilaç ve kozmetik endüstrisinde kullanılan noniyonik deterjanlar zayıf germisid etkilidirler. %20 lik konsantrasyonda yara temizleyici olarak kullanılan Puluronic F-68 dışında yaraların sabun ile yıkanması enfeksiyon insidansını arttırır (11). Katyonik gruptan, kuarterner amonyum ve piridinyum tuzları antiseptik ve dezenfektan olarak kullanılırlar. Bu ilaçlar besin ve süt endüstrisinde kapların temizlenmesi ve dezenfeksiyonu için de kullanılırlar.

Katyonik deterjanlar, bakteriyostatik etkilidir ve yeterli konsantrasyonlarda bakterisit etki de oluştururlar. Antibakteriyel etkileri bakterilerin sitoplazma membranlarının permeabilitesini artırmalarına bağlıdır (12,13). Antimikrobik spektrumları nispeten dardır.

Gram pozitif bakteriler üzerinde, gram negatif bakterilere göre daha güçlü etki yaparlar. Pseudomonas, Serratia türleri ve E.coli gibi gram negatif bakteriler üzerine etkileri çok zayıftır. Bundan dolayı solüsyonları pseudomonas ve Serratia ile kontamine olabilir. Fungistatik etkinlikleri fazla değildir. M. tubercülosis ve bakteri sporları üzerine etkisizdirler. Bazı virüsleri (Herpes simpleks, vaksinia ve adenoviruslar gibi lipofilik virüsleri) etkileyebilirler. Kapsülle sarılmış virüsleri yıkabilirler fakat çıplak virüslere dokunmazlar (13).

Katyonik deterjanların bazı yönlerden diğer antiseptik ve deterjanlara göre üstünlükleri vardır (13).

i) Düşük konsantrasyonlardaki solüsyonlar halinde bile etkindirler ve bu fazla dilüe solüsyonların doku üzerindeki toksik etkisi çok düşüktür, sistemik toksisiteyi de nispeten zayıftır.

ii) Moleküllerinde katyonik uç yanında uzun bir lipofilik karbon zinciri bulunduğu için doku içine iyi nüfuz ederler, keratolitik etki göstermeleri cilde nüfuz yeteneklerini artırır.

iii) Germisid etkileri iyod, alkol veya formaldehitinki kadar olmasa bile çabuk başlar. Cilde uygulandığında benzalkonyum klorür solüsyonu bakteri sayısını yaklaşık olarak 25 dakika içinde %90 oranında azaltabilir.

iv) Madeni veya kauçuktan yapılmış cerrahi malzeme (eldivenler gibi) üzerinde korozif etkileri yoktur, temas ettikleri malzeme ve örtüleri boyamazlar.

v) Nispeten ucuzdurlar.

Bu üstünlükleri yanında bazı sakıncaları da vardır (13).

i) Sabunlarla ve evlerde temizlik için kullanılan diğer anyonik deterjanlar ile bir arada kullanıldıklarında kimyasal etkileşim sonucu inaktive edilirler; aynı şekilde iyot, potasyum permanganat, gümüş tuzları ve çinko sülfat ile de geçimsizlik gösterirler.

ii) Etkinlikleri pH ya bağlıdır. Bazik ortamlarda etkileri daha fazladır.



iii) Sporları etkilemezler.

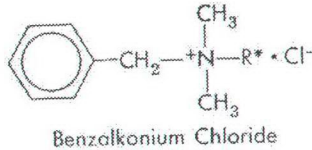
iv) Etkinlikleri ortamda organik materyal (kan, irin, nekrotik doku , eksüda vb.) varsa azalır.

v) Yara üzerine uygulandıklarında, iç tarafında bakterisit etkinliği düşük olan bir tabaka oluşturur ve böylece derindeki bakterilerin etkilenmemelerinden ötürü canlı kalmalarına neden olurlar.

vi) Plastik, lastik, pamuk ve pamuk liflerinden yapılmış eşya ve aletlerin yüzeyleri üzerinde adsorbe olduklarından bunlarla temas halinde etkinlikleri azalır. Solüsyonları bazen, dirençli gram negatif bakterilerle kontamine olabilirler ve hastanelerde nozokomiyal enfeksiyon kaynağı teşkil edebilirler. Klorür, bikarbonat, fosfat ve sitrat tuzları tarafından çöktürülürler.

Antiseptik ve dezenfektan olarak kullanılan katyonik deterjanların başlıcaları, benzalkonyum klorür, setiltrimetilamonyum bromid, setilpiridinyum klorür, benzetyonyum klorür ve klorheksidin'dir. Bunların içinde en sık kullanılan benzalkonyum klorürdür. Bu maddenin %0.01-0.1 lik solüsyonları cilt ve mukoza yüzeyine antiseptik olarak uygulanır ve bazı farmakolojik formülasyonlarda prezervatif madde olarak bulunurlar (12).

En sık kullanılan kuarterner amonyum bileşiği olan benzalkonyum kloridin yapısı aşağıdaki gibidir.



## ETKİ VE KULLANIM

Tıp da kuarterner amonyum bileşikleri deride, mukoza ve dokularda antiseptik gerektiren her alanda ve tıbbi alet ve cerrahi aletlerin dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır.

**Antiseptik olarak kullanımı:** Kuarterner amonyum antiseptikler etkili konsantrasyonlarda dokular için göreceli olarak nonirritandır. Etkisini çok çabuk gösterir. Sıvı olarak kullanılır ve doku yüzeyini penetre ederek deterjan etkisi gösterir. Keratolitik etkiye sahiptir. Göreceli olarak düşük bir sistemik toksisitesi vardır fakat oral yolla alınması sonrasında zehirlenme gözlenmiştir. Bu ajanların akılda tutulması gereken en önemli kusuru etkilerinin sabunlarla, doku elemanları ve cerahat ile antagonize edilebilmesidir. Ayrıca cilde uygulandığında altında bakterilerin canlı kalabileceği bir film tabaka oluştururlar. Bu film tabakanın iç yüzeyi düşük bakterisidal etkiye sahipken dış yüzey kuvvetli bakterisidal özelliğindedir. Bunlar sporları öldürmezler. İodin aktivitesi ile karşılaştırıldığında aktiviteyi daha yavaştır. %0.1 lik Benzalkonyum klorid insan cildine uygulandığında oradaki bakteriyal popülasyonu % 50 azaltmak için yedi dakika ya ihtiyacı vardır. %70 lik etanolden daha yavaştır. %0.002 lik solüsyonu E.coli nin % 98 ini öldürebilmek için dokuz saate ihtiyaç duyar. Bu düşük konsantrasyon üriner sistemin lavajında ve irrigasyonunda kullanılan konsantrasyona yakındır. Katyonik sürfaktanlar keratin ile interaksiyona girerler ve epidermal hasar oluştururlar. Ancak sürekli kullanım dışında bu etki çok fazla değildir (12). Benzalkonyum klorür ilk olarak 1935 yılında antiseptik ajan olarak klinik kullanıma sunulmuştur. %10 luk benzil alkol konsantrasyonları uzun yıllar dezenfektan olarak ve %1 lik konsantrasyonları da injektabel preparatlarda additive olarak kullanılmıştır. 1982 yılında farmakolojik karışımlar içinde inaktif madde olarak Food Drug Administration (FDA) tarafından ABD de onay almıştır. Bu tarihten beri yaygın olarak kullanılmakta ve günümüzde de pek çok nazal sprey ve damlalara prezervatif madde olarak katılmaktadır. Bu kullanım sadece burunda kısıtlı değil göz ve akciğer için hazırlanan preparatlarda da kullanılmaktadır. Sistemik toksisitesi hakkında pekçok raporlar bildirilmiştir. Anti astmatik preparatlarda kullanılması ile bronkokonstrüksiyon (14,15), lökositler üzerinde inhibitör etki ve göz damlaları kullanımı ile izlenen toksik reaksiyonlar tanımlanmıştır (16). Benzil alkol içeren preparatlara uzun süre maruz kalma sonrasında nörotoksite geliştiği hatta bu preparatların intratekal uygulamaları sonrasında parapleji geliştiği rapor edilmiştir (17). 1982 de intravenöz kataterlerin temizlenmesi ve saklanması için kullanılan ve benzil alkol

içeren bakteriostatik solüsyonlar sebebiyle yeni doğan prematürelerin toksik dozda benzoik asit aldığı keşfedilmiştir (17). Bu tarihten sonra bu ajanlar yeni doğanlarda göreceli olarak düşük kiloda olmaları ve toleransının az olması sebebiyle injektable preparatlarda kullanılmamaya başlanmıştır. Belirtilmesi gereken bir nokta da bu maddelerin kronik kullanımlarda zaman zaman alerjik reaksiyonlara sebep olabildikleridir (17). Sonuç olarak dezavantajlar avantajlara göre daha ağır basmaktadır diyebiliriz. Ancak daha üstün özelliklere sahip prezervatifler bulununcaya kadar da bu grup ajanlar antiseptik olarak kullanılmaya devam edecektir.

**Dezenfektan olarak kullanımı:** Yüzey aktif ajanlar hastanelerde tıbbi aletlerin temizliği ve sterilizasyonunda geniş olarak kullanılmaktadır. Ancak lateks eldivenler, cerrahi süngerler ve benzeri gözenekli materyaller ile polietilen veya polipropilenden yapılmış endoskop gibi objeler kuarternere amonyum antiseptiklerini adsorbe ederler ve aynı dezenfektan solüsyonunun gözenekli materyallerin sterilizasyonu için tekrar eden kullanımlarında solüsyonun konsantrasyonu düşer ve etkisi azalır (12).

## **POTASYUM SORBAT**

Potasyum sorbat sorbik asitin potasyum tuzudur. Sorbik asit doymamış bir yağ asitidir. Potasyum sorbatın primer inhibitör etkisi maya ve mantarlara karşıdır (18). Potasyum sorbat aynı zamanda bakteriler üzerine de oldukça etkili bir bakteriostatik ajandır. Gram pozitif, gram negatif, katalaz pozitif, katalaz negatif, aerobik, anaerobik ve mezofilik pek çok mikroorganizmaya karşı inhibitör etkilidir (18). Potasyum sorbatın antimikrobiyal etkisi ortamın pH ve ısısı ile ilişkilidir. Isının ve pH'nın düşmesi ile etkisi artar. Potasyum sorbatın etkili antimikrobiyal konsantrasyonu %0.05-0.3 arasındadır. Potasyum sorbatın bakterileri inhibe edici etkisi lag fazını uzatarak ortaya çıkar (18). 1940 lı yıllardan beri yiyecek endüstrisinde prezervatif olarak kullanılan bu madde son yıllarda jinekolojide mantar enfeksiyonlarının tedavisinde ve ilaç sanayiinde prezervatif olarak kullanılmaya başlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Benzalkonyum klorid ve potasyum sorbatın uzun ve kısa dönem kullanımlarında olası zararlı etkilerini araştırmak için yapılan bu in vivo çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (D.E.Ü.T.F.) bünyesinde aynı laboratuarda üretilmiş ve aynı jenerasyondan ağırlıkları 350-450gr arasında olan 56 sıçan 5 gruba bölünerek incelendi. Çalışmamızda sıçan kullanılmasının sebebi sıçanların solunum yolu mukozasının insan solunum yolu mukozası ile yapısal, fonksiyonel ve metabolik olarak çok büyük benzerlik göstermesidir(19).

Prezervatif madde uygulamasına başlamadan önce sıçanlar bir hafta boyunca allerjik veya enfeksiyona bağlı bir riniti düşündürecek belirgin burun akıntısı, sık sık veya artarda akırma, ön ayakları ile burunlarını kaşımak gibi bulgular yönünden izlendi. Sıçanların tamamen sağlıklı olduklarından emin olunarak çalışmaya dahil edildiler.

1. Grup : Günde iki kez her bir burun deliğine 7 mL olmak üzere mikropipet yardımıyla saat 08:00 ve 20:00 da 4 hafta boyunca intranazal % 0,9 NaCl solüsyonu uygulandı.
2. Grup : Günde iki kez her bir burun deliğine 7 mL olmak üzere mikropipet yardımıyla saat 08:00 ve 20:00 da 1 hafta boyunca intranazal % 0,01 oranında benzalkonyum klorid solüsyonu (  $C_{12}H_{25}N(CH_3)_2C_7H_7Cl$  ) uygulandı. (***Sigma B6295***).
3. Grup : Günde iki kez her bir burun deliğine 7 mL olmak üzere mikropipet yardımıyla saat 08:00 ve 20:00 da 1 hafta boyunca intranazal % 0,12 oranında potasyum sorbat solüsyonu ( $C_6H_7KO_2$ ) uygulandı. (***Sigma 47848***).
4. Grup : Günde iki kez her bir burun deliğine 7 mL olmak üzere mikropipet yardımıyla saat 08:00 ve 20:00 da 4 hafta boyunca intranazal % 0,01 oranında benzalkonyum klorid solüsyonu uygulandı.
5. Grup : Günde iki kez her bir burun deliğine 7 mL olmak üzere mikropipet yardımıyla saat 08:00 ve 20:00 da 4 hafta boyunca intranazal % 0,12 oranında potasyum sorbat solüsyonu uygulandı.

Sıçanlara uygulanan prezervatif maddeler Sigma Aldrich şirketinden sağlanarak belirtilen konsantrasyonlardaki solüsyonlar D.E.Ü.T.F. Farmakoloji Anabilim Dalı'nda hazırlandı.

1 ve 4 haftalık uygulamalar sonrasında sıçanlar probofol anestezisi altında dekapite edilerek kafa derileri soyuldu ve burun içindeki mukozaya dokunmamaya son derece özen gösterilerek burun boşluğu açığa çıkarıldı.(Resim 8 ve 9) Tüm sıçanlardan standart olarak



septumun 1/3 orta ve alt bölgesinden alınan örnekler elektron mikroskobu ve ışık mikroskobu düzeyinde incelenmek üzere hazırlandı. Örneklerin elektron mikroskobik inceleme için hazırlanması Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Laboratuvarında yapıldı. Preparasyon sırasında kullanılan fiksatifler ve tampon solüsyonları ise Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda hazırlandı.

Işık mikroskobu düzeyinde incelenecek septal mukoza örneğinden hazırlanan preparatlar hematoksilen eozin (H.E.) ile boyandıktan sonra aynı patolog tarafından silia kaybı, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, skuamöz metaplazi, intraepidermal gland gelişimi, vasküler yapılarda artmanın olup olmaması ve subepitelial ödem yönünden incelendi.

Scanning elektron mikroskopik değerlendirmede Joel ve Zeiss DSM 982 Gemini elektron mikroskopları kullanıldı. Yapılan yüzey taraması ve değerlendirmenin yanı sıra Agfa Pan AXP 25 marka film kullanılarak kayda değer histopatolojik bulguların fotoğrafı çekildi. Transmisyon elektron mikroskobik çalışmada ise Zeiss ve Philips CM 12 transmisyon elektron mikroskopları kullanılarak ultrastrüktürel değişiklikler incelendi ve Kodak SO 163 marka film kullanılarak kayda değer bulgular fotoğraflandı.

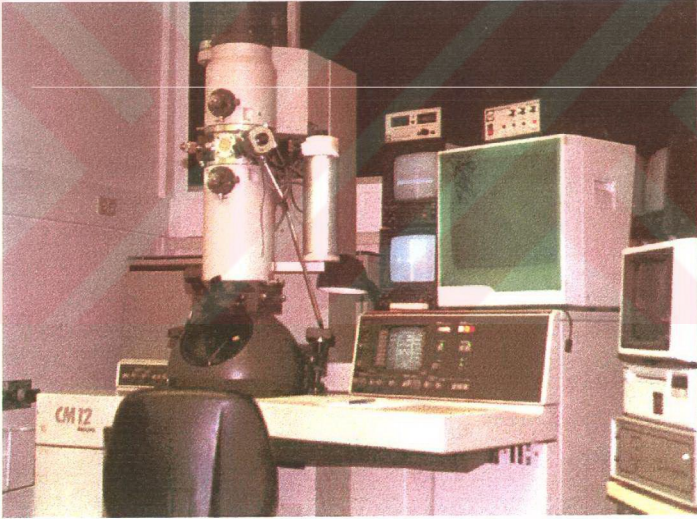
Bu çalışmada transmisyon elektron mikroskobu ile yapılacak değerlendirme için hazırlanan epon bloklardan önce kalın kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyandı ve ışık mikroskobu ile incelendi. Bu ilk değerlendirme ile her bir grubun temel özelliklerini yansıtan dörder blok belirlenerek bu bloklardan ince kesitler alındı ve transmisyon elektron mikroskobu ile incelendi.

Scanning elektron mikroskobu için de her gruptan 8'er örnek hazırlandı. Ancak preparasyon aşamasında ve plakalara yapıştırma sırasında bazı örnekler değerlendirme dışı bırakıldı. 1. gruptan 6 örnek, 2. gruptan 6 örnek, 3. gruptan 8 adet, 4. gruptan 7 adet ve kontrol grubundan da 3 adet örnek scanning elektron mikroskobu ile değerlendirildi.

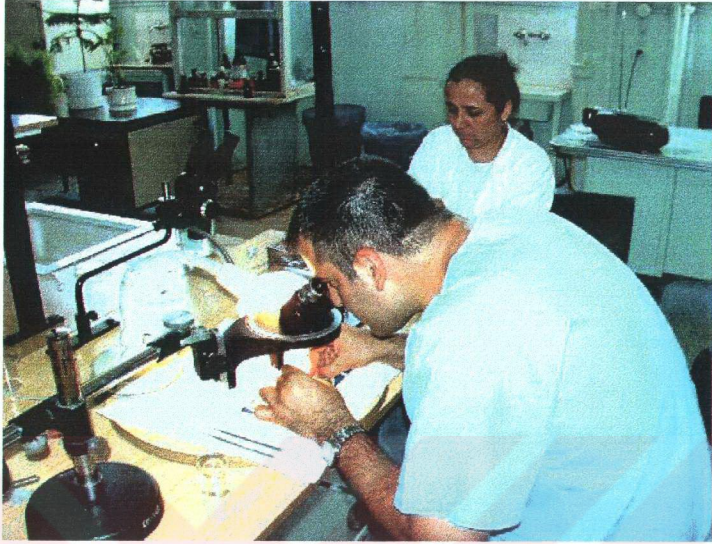
Işık mikroskobu ile elde edilen bulgular istatistiksel olarak analiz edildi ve sonuçlar elektron mikroskobu ile elde edilen bulgular ile birlikte değerlendirildi. Işık mikroskobu ile yapılan çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda, transmisyon elektron mikroskobu ile yapılan değerlendirme Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında ve scanning elektron mikroskobu ile yapılan çalışma da Ege Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesinde gerçekleştirildi. Ayrıca ultrastrüktürün net olarak ortaya konamadığı ve daha büyük büyütmelerde görüntülenmesi gereken bazı seçilmiş preparatlar scanning elektron mikroskobu ile incelenmek üzere Berlin Humbolt Üniversitesi bünyesindeki Virchow Kliniği Patoloji bölümünde ve transmisyon elektron mikroskobu ile ileri incelemeler ise Freie Universität Berlin Forschungszentrum

für Elektronenmikroskopie’de değeriendirildi ve istenen bölgelerin çeşitli büyütmelelerdeki görüntüleri bu merkezlerde elde edildi..

İstatistiksel analizlerde anlamlılık derecesi olarak  $\alpha = 0.05$  kabul edildi. İntraepitelial gland gelişimi ve skuamöz metaplazi gelişimi gruplar arasında Ki-kare ( $\chi^2$ ) testi ile değeriendirildi. Ayrıca gruplar arasında ödem, enflamatuvar hücre infiltrasyonu ve damarsal yapılarda artış skorları kontrol grubu ile Kruskal Wallis metoduyla test edildi. Test sonucunda farkların istatistiksel olarak anlamlı bulunması üzerine gruplar yukarıdaki değerişkenler bakımından ikili analizlerinde Bonferroni düzeltmesi yapılarak ( $p = 0.0063$ ) Mann-Whitney U testine tabii tutuldu. Ayrıca uzun dönem prezervatif madde uygulanan iki grup arasında Fisher’s Exact Test kullanıldı.



Resim 6. Philips CM 12 Transmisyon elektron mikroskobu



Resim 7. Diseksiyon mikroskobu ile Tüm siçanlardan örnekler standart olarak septumun 1/3 orta ve alt bölgesinden alındı.

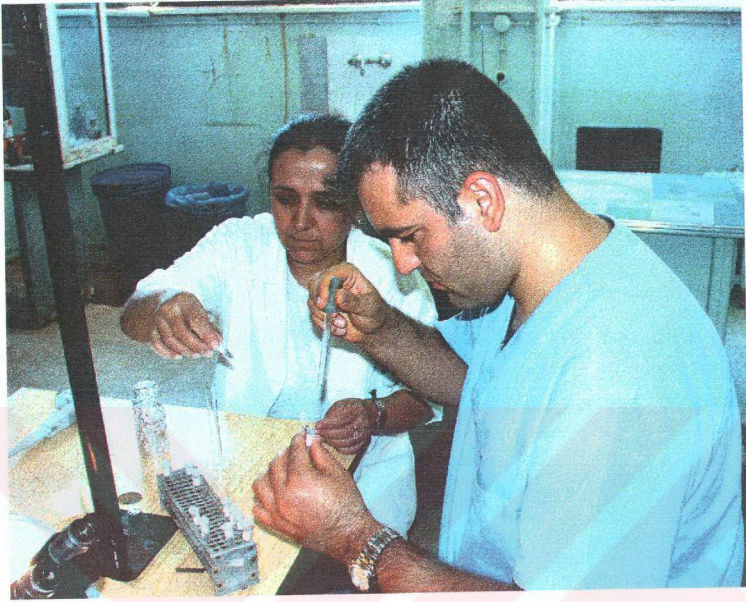


Resim 8. Dekapite edilerek burun yan duvarı açılmış ve septumu ortaya konmuş siçanın üstten görünüşü.



Resim 9. Dekapite edilerek burun yan duvarı açılmış ve septumu ortaya konmuş siçanın yandan görünüşü.





Resim 10. Elektron mikroskobu için preparat hazırlığı.

## ELEKTRON MİKROSKOBU TAKİBİNDE KULLANILAN FİKSATİFLER VE TAMPONLAR (20)

### Glutaraldehit fiksatif (=Milloning Fiksatif )

Araştırmalarda glutaraldehit ile yapılan tespitlerde, ince yapının iyi bir şekilde muhafaza edildiği tespit edilmiştir. Glutaraldehit'i osmium tetroksid'li bir fiksatif takip edecek olursa bu şekilde yapılan çifte fiksasyon sonunda elde edilen ince yapı muhafazasının çok daha iyi olduğu ortaya konmuştur (13).



## Milloning tamponu

- A: 13,36 gr. Na HPO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O.....300 ml.  
B: 15,36 gr. NaOH .....300 ml.  
C: 32,4 gr. sukroz.....300 ml.  
D: 207,5 ml. A solusyonu+ 42,5 ml. B solusyonu

Tampon solusyonu, 25 ml. C solusyonu üzerine 25 ml. D solusyonu eklenip total volum distile su ile 500 ml.'ye tamamlanarak (pH: 7,2- 7,4) hazırlandı. Hazırlanan bu tampon solusyonu % 25'lik ticari gluteralehit solusyonu ile 1:9 oranında karıştırılarak %2,5'luk gluteralehit fiksatif elde edildi.

## Osmium tetroksit fiksatif

Stok solüsyon hazırlamak için kullanılan şişenin kahverengi, geniş ağızlı ve camdan yapılı kapağının şişe ağzına iyice uyması hususuna özen gösterildi. Şişe kullanılmadan önce distile su ile önceden iyi bir şekilde temizlendi. Önceden temizlenmiş ve bu amaç için kullanılacak 100 cc' lik geniş ağızlı cam kapaklı şişe bir gece süre ile kesif sülfürik asidte bırakıldı. Sonra distile su ile defalarca yıkandı ve etüvde kurutuldu. Bu şişe içine 50 cc. distile su konduktan sonra osmium tetroksidin 1 gr'lık ampülü şişe içinde kırıldı. Osmium tetroksid ampülü de daha önceden iyice temizlendi. Bunun için önce ampulün etiketi çıkarıldı sonra ampulün bir ucuna yakın bir yeri ampul testeresi ile halka şeklinde çizildikten sonra distile su ile yıkandı. Yıkamayı takiben en az bir saat süre ile kesif sülfürik asidte bırakılan ampul şişenin temizlenmesinde olduğu gibi distile su ile yıkandı.

Sonra ucu aleve tutulmuş bir pens yardımıyla tutulup çizilen ucu bir benzen alevinde ısıtılan ampul 50 cc. distile su bulunan şişe içine atıldı. Sıcak ampul soğuk suya temas edince testere ile çizilmiş yerinden parçalanarak osmium tetroksit kristalleri distile su içine karıştı ve osmium tetroksit kristalleri oda ısısında erimeye bırakıldı. Bu şekilde hazırlanmış %2'lik osmium tetroksit eriyiği çok açık sarı renkte ve berrak görünüşlüdür. 4°C' de birkaç hafta saklanabilir.

### Tuzlu fosfat tamponu

0,663 gr.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$   
4,04 gr.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
8,78 gr.  $\text{NaCl}$

Yukarıdaki maddeler belirtilen oranlarda 1000 ml. Distile suda eritildi. Bu solüsyonun pH'sının 7,4 olmasını sağlamak için bir pH metre ile bir yandan ölçüm yapılırken diğer yandan 1 N. NaOH solüsyonu damlatılarak tuzlu fosfat tamponu hazırlandı. Kullanılacak osmium tetroksit fiksatif için  $\text{OsO}_4$  stok solüsyonu ve tuzlu fosfat tamponu 1:1 oranında karıştırıldı. Böylelikle postfiksasyon için  $\text{OsO}_4$  fiksatif elde edilmiş oldu.

## ELEKTRON MİKROSKOPU İLE YAPILAN İNCELEMELERDE KULLANILAN BOYALAR, BUNLARIN HAZIRLANMASI VE BOYAMA YÖNTEMLERİ (20)

### Uranyl Asetat Hazırlanışı

Uranyl Asetat \_\_\_\_\_ 3,75 gr.  
Distile su \_\_\_\_\_ 50 cc.

Stok solüsyonu hazırlamak için 250 ml'lik erlenmayer kabına 50cc. kaynatılmış soğutulmuş distile su ve 3,75 gr. uranyl asetat kondu ve 15 dakika karıştırıldı. Erlenmayer parafin ile kapatılarak 1-2 saat buzdolabında bekletildi.

Stok solüsyonundan bir pastör pipet yardımıyla 5 ml alınarak 15 ml.'lik konik santrifüj tübüne kondu ve üzerine 5 ml etanol eklenerek 1800 devirde + 4° de 20 dakika soğuk santrifüj yapıldı.

### **Kesitlerin Uranyl Asetat ile Boyanması**

Santrifüj yapılan solüsyondan boya kaplarına yeterli miktarda konarak içersine gridler üzerine alınmış doku kesitleri yerleştirildi. 5 dakika bekletildikten sonra gridler pens yardımıyla çıkartılıp distile su ile yıkandı ve petri kutularında kurumaya bırakıldı.

### **Kurşun Boyası**

Kurşun nitrat ( $Pb(NO_3)_2$ ) \_\_\_\_\_ 1,33 gr.

Sodyum sitrat ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 5,5 H_2O$ ) \_\_\_\_\_ 2,137 gr

50 ml. lik cam şişeye 30 ml. kaynatılmış distile su konulup yukarıda listelenen maddeler yanlarında belirtilen oranlarda distile suya eklendi. Bunların da üzerine 8 ml. 1 N NAOH eklendi. Toplam hacim 50 ml. distile suyla tamamlanarak stok solüsyonu hazırlandı. Stok solüsyonundan pastör pipeti yardımıyla 10 ml. Alınarak 15 ml.'lik santrifüj tüpüne kondu. Soğutmalı santrifüjde 1800 devirde 20 dakika santrifüj yapıldı.

### **Kesitlerin Kurşun ile Boyanması**

Boyama işleminde üzerinde gridlerin capına uygun delikler bulunan dişçi mumundan hazırlanmış özel kaplar kullanıldı. Deliklerin her birine kurşun boyası damlatılarak gridler bu yuvaların üzerine kapatıldı. Dişçi mumunun bir kenarına ortamın nemini alması için NaOH'dan bir parça kondu. 20 dakika bekletilen gridler çıkarılıp tridistile su ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı.

## TRANSMİSYON ELEKTRON MİKROSKOBU İÇİN PREPARAT HAZIRLAMA YÖNTEMİ (20)

Dekapite edilecek sıçana öncelikle fosfat tamponlu gluteraldehit solüsyonu infüzyonu yapılarak tüm dokuların henüz canlılığını yitirmeden tespiti sağlandı.

Alınan doku fosfat tamponlu gluteraldehit solüsyonu içinde en az iki saat bekletilerek ilk tespit işlemi tamamlandı.

Tespit edilen parçalar fosfat tamponuna alındı. Burada en az 30 dakika bekletilen parçalar post fiksasyon için 1:1 oranında hazırlanmış osmium tetroksit (OsO<sub>4</sub>) + Milloning tamponu içerisine bırakılarak 1 saat 30 dakika bekletildi ve takiben parçalar temiz bir tüpe alındı. Üzerine milloning tamponu ilave edilip 15 dk. bekletildi. Yapılan bu işlemlerden sonra parçaları dehidrate etmek için sırasıyla;

- % 50 Alkol içinde 15 dk,
- % 50 Alkol içinde tekrar 15 dk,
- % 70 Alkol içinde 25 dk,
- % 80 Alkol içinde 25 dk,
- %85 Alkol içinde 25 dk,
- %90 Alkol içinde 25 dk,
- % 95 Alkol içinde 25 dk,
- % 100 Alkol içinde 30 dk,
- % 100 Alkol içinde bu kez 15 dk bekletildi ve sonra,
- 1:1 oranında hazırlanmış % 100 Alkol ve propilenoksit içinde 50 dk.,
- Saf propilenoksit içinde 30 dk. ve tekrar
- Saf propilenoksit içinde 30 dk. bekletildi ve temiz tüplere alınan parçalar,
- 2:1 oranında hazırlanan propilenoksit + epon karışımının içerisine konarak 60 dk. bekletildi ardından
- 1:2 oranında hazırlanan propilenoksit + epon karışımının içerisinde 60 dakika bekletildi. Sonrasında parçalar,

DMP-30'suz Epon karışımına alınarak 1 gece parçalar çökene kadar buzdolabında +4 C<sup>o</sup> de bekletildi.

Parçalar daha sonra,

- %1.5-2 oranında DMP-30 ihtiva eden epon içerisinde BEEM 036 piramidal kapsüllere gömüldü.
- 37 C° etüvde 24 saat tutuldu.
- Etüv ısısı 45 C° ye yükseltilerek 24 saat daha ve
- Etüv ısısı 60 C° ye yükseltilerek parçaların bir 24 saat daha etüvde tutuldu.
- Sonunda etüvden alınan parçaların tamamen sertleşmesi için yaklaşık 5 gün oda ısısında beklemesi sağlandı.
- Leica ultra mikrotom aracılığıyla elektron mikroskobu için 60 nonametre kalınlığında ince kesitler alınarak 3,05 mm. çaplı Gilder grids G 200 bakır gridler üzerine yerleştirildi.
- Gridler Uranil Asetat ile boyama için mat yüz solüsyona temas edecek şekilde ters kapatıldı ve 20 dakika bekletildi.
- Sonra borulu polietilen yıkama şişesinde saf su ile yıkama yapıldı.
- Gridler kurduktan sonra ikinci boyama olan Kurşun Sitrat boyamasına geçildi. Önceden hazırlanmış olan 4 mm'lik dişçi mumlu petri kutularına grid sayısı kadar damlatılan kurşun sitrat boyası üzerine gridler mat tarafı solüsyona temas edecek şekilde yerleştirildi. Havadaki karbondioksiti alması için hazırlanmış olan petri kutusunun bir kenarına sodyum hidroksit (NaOH) konuldu.
- 20 dakika sonunda gridler boyadan çıkarılıp yıkandı ve kurutuldu. Böylece preparatlar incelenmeye hazır hale getirildi.

## SCANNING ELEKTRON MİKROSKOBU İÇİN PREPARAT HAZIRLAMA YÖNTEMİ (20)

Alınan doku % 2,5'luk fosfat tamponlu gluteraldehit içinde en az iki saat bekletilerek ilk tespit işlemi tamamlandı.

Tespit edilen parçalar fosfat tamponuna alındı. Burada en az 30 dakika bekletilen parçalar post fiksasyon için 1:1 oranında hazırlanmış osmium tetroksit (OsO<sub>4</sub>) + Milloning tamponu içerisine bırakılarak 1 saat 30 dakika bekletildi ve takiben parçalar temiz bir tüpe alındı.

Üzerine milloning tamponu ilave edilip 15 dk. bekletildi. Yapılan bu işlemlerden sonra parçaları dehidrate etmek için sırasıyla;

- % 50 Alkol içinde 15 dk,
- % 50 Alkol içinde 15 dk,
- % 70 Alkol içinde 25 dk,
- % 80 Alkol içinde 25 dk,
- %85 Alkol içinde 25 dk,
- %90 Alkol içinde 25 dk,
- % 95 Alkol içinde 25 dk,
- % 100 Alkol içinde 30 dk,
- % 100 Alkol içinde bu kez 15 dk bekletildi ve sonra,
- Hekzametil disilazan solüsyonu içinde 5 dakika bekletildi ve solüsyondan dışarıya alınarak oda ısısında havalandırıldı.
- Parçalar bir gün boyunca havalandırıldıktan sonra scanning elektron mikroskobu taşıyıcılarının üzerine likit karbon yapıştırıcı ile prinç taşıyıcılara yapıştırıldı ve "sputter coating" cihazında yaklaşık olarak 200 angström altın ile kaplandı.



## BULGULAR

### Semptomatik Değişiklikler

İkinci günden itibaren bu maddelerin uygulanmasını takiben kontrol grubu dışında hemen hemen tüm sıçanlarda hapsirme ataklarının geliştiği izlendi. Sıçanlara benzalkonyum klorid ve potasyum sorbat uygulanmaya başladıktan yaklaşık 6 gün sonra burunlarında kızarıklık geliştiği ve ön ayakları ile burunlarını kaşıma eylemi gösterdikleri fark edildi. Benzalkonyum klorid uygulanan gruplarda özellikle de 4 hafta prezervatif madde uygulanan gruplarda daha belirgin olmak üzere bazı sıçanlarda burundan sesli solunumun geliştiği gözlemlendi. Kontrol grubunda özellik gösteren hiçbir bulgu gözlenmedi. Tablo I ve Tablo II de ayrıntılı olarak gruplara göre gelişen semptomlar gösterilmiştir.

TABLO I

Benzalkonyum Klorid Uygulanan Grupta İzlenen Semptomatik Değişiklikler

<i>Semptom</i>	<i>1 hafta (n=11)</i>	<i>4 hafta (n=11)</i>	<i>Kontrol (n=12)</i>
<i>Burun akıntısı</i>	0	0	0
<i>Hapsirme</i>	11	11	0
<i>Burunda kızarıklık</i>	11	11	0
<i>Nazal sesli solunum</i>	3	5	0

TABLO II

Potasyum Sorbat Uygulanan Grupta İzlenen Semptomatik Değişiklikler

<i>Semptom</i>	<i>1 hafta (n=11)</i>	<i>4 hafta (n=11)</i>	<i>Kontrol (n=12)</i>
<i>Burun akıntısı</i>	0	0	0
<i>Hapsirme</i>	10	9	0
<i>Burunda kızarıklık</i>	10	11	0
<i>Nazal sesli solunum</i>	2	4	0

## Histolojik Değişiklikler:

### Işık Mikroskobu ile Değerlendirme

Kontrol grubunda 4 haftalık % 0.9 NaCl uygulamasını takiben yapılan ışık mikroskobik değerlendirmede nazal septumda tamamen sağlıklı yalancı çok katlı titrete tüylü bir solunum yolu epiteli izlendi. Prezervatif solüsyonların uygulandığı gruplarda izlenen temel problemler sırasıyla enflamatuar hücre infiltrasyonu, damarsal yapılarda artış, intraepitelial gland gelişimi, skuamöz metaplazi ve ödematöz değişiklikler olarak kaydedildi. Skuamöz metaplazi ve intraepitelial gland oluşumunun gelişip gelişmediği ve enflamatuar hücre infiltrasyonu, ödem ve damarsal oluşumlardaki artış da hafif, orta, şiddetli veya patoloji izlenmedi şeklinde skorlanarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

Prezervatif madde uygulanan tüm gruplarda dikkati çeken ilk bulgu ödemdi. (Grafik 1). Ödem gelişimi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm gruplar için istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ). Ödem miktarı 4 hafta prezervatif solüsyonu uygulanan gruplarda daha fazla gözlenirken özellikle benzalkonyum klorid uygulanan gruplarda potasyum sorbat uygulanan gruplara göre daha fazla olarak izlendi ancak prezervatif madde uygulanan tüm gruplar arasında ödem yönünden istatistiksel bir anlamlılık saptanmadı ( $p > 0.0063$ ).

Diğer önemli bulgu nazal mukozadaki enflamatuar hücre infiltrasyonuydu. Enflamatuar hücre infiltrasyonu prezervatif solüsyonu uygulanan gruplardaki olgularda hafiften şiddetliye farklı yoğunluklarda tespit edildi (Grafik 2). Prezervatif madde uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında farkın anlamlı olduğu saptandı ( $p < 0.05$ ),

Ödem	Yok	Hafif	Orta	Belirgin
<b>Kontrol Grubu</b> <i>n=12</i>	9	3		
<b>Benzalkonyum klorid</b> <i>1Hf n=11</i>	1	3	3	4
<b>Benzalkonyum klorid</b> <i>4Hf n=11</i>	-	4	6	1
<b>Potasyum sorbat 1Hf</b> <i>n=11</i>	2	3	6	-
<b>Potasyum sorbat 4Hf</b> <i>n=11</i>	-	3	7	1

Tablo 1. Gruplara göre ödem gelişimi ve şiddeti.



<i>İnfiltrasyon</i>	<i>Yok</i>	<i>Hafif</i>	<i>Orta</i>	<i>Şiddetli</i>
<b>Kontrol Grubu</b> <i>n=12</i>	12	-	-	-
<b>Benzalkonyum klorid</b> <i>1Hf n=11</i>	-	5	6	-
<b>Benzalkonyum klorid</b> <i>4Hf n=11</i>	-	2	1	8
<b>Potasyum sorbat 1Hf</b> <i>n=11</i>	-	7	3	1
<b>Potasyum sorbat 4Hf</b> <i>n=11</i>	-	-	1	10

Tablo 2. Gruplara göre dokularda izlenen beyaz küre infiltrasyonu ve derecesi.

<i>Vaskülarite Artışı</i>	<i>Yok</i>	<i>Hafif</i>	<i>Orta</i>	<i>Şiddetli</i>
<b>Kontrol Grubu</b> <i>n=12</i>	10	2	-	-
<b>Benzalkonyum klorid</b> <i>1Hf n=11</i>	-	-	9	2
<b>Benzalkonyum klorid</b> <i>4Hf n=11</i>	-	-	1	10
<b>Potasyum sorbat 1Hf</b> <i>n=11</i>	-	-	10	1
<b>Potasyum sorbat 4Hf</b> <i>n=11</i>	-	-	2	9

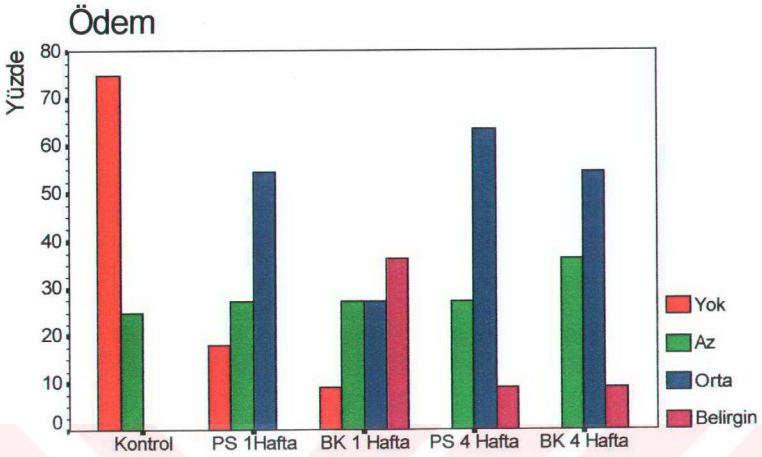
Tablo 3. Prezervatif uygulaması sonrasında gözlenen vaskülaritedeki artışın ve şiddetinin gruplar arasındaki dağılımı.

<i>İntraepitelial Gland</i>	<i>Yok</i>	<i>Var</i>
<b>Kontrol Grubu</b> <i>n=12</i>	12	-
<b>Benzalkonyum klorid</b> <i>1Hf n=11</i>	10	1
<b>Benzalkonyum klorid</b> <i>4Hf n=11</i>	5	6
<b>Potasyum sorbat 1Hf</b> <i>n=11</i>	11	-
<b>Potasyum sorbat 4Hf</b> <i>n=11</i>	8	3

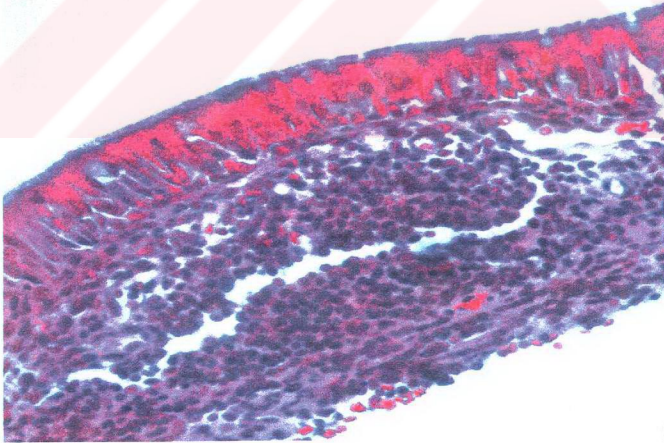
Tablo 4. İntraepitelial gland gelişen örneklerin gruplara dağılımı.

<i>Skuamöz Metaplazi</i>	<i>Yok</i>	<i>Var</i>
<b>Kontrol Grubu</b> <i>n=12</i>	12	-
<b>Benzalkonyum klorid</b> <i>1Hf n=11</i>	11	-
<b>Benzalkonyum klorid</b> <i>4Hf n=11</i>	5	6
<b>Potasyum sorbat 1Hf</b> <i>n=11</i>	11	-
<b>Potasyum sorbat 4Hf</b> <i>n=11</i>	7	4

Tablo 5. Skuamöz metaplazi izlenen örneklerin gruplara dağılımı.

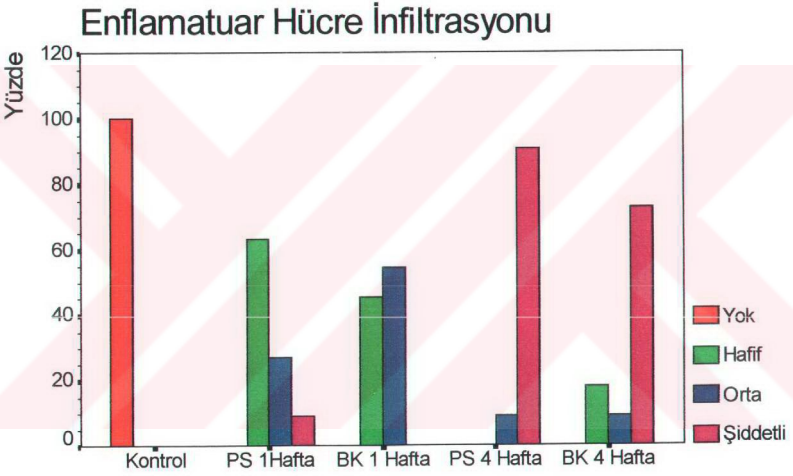


Gratik 1: Gruplara göre izlenen subepitelial ödem ve ödem şiddeti.



Resim 11. 4 hafta potasyum sorbat uygulanan nazal mukozada belirgin enflamatuar hücre infiltrasyonu (H.E. x200).

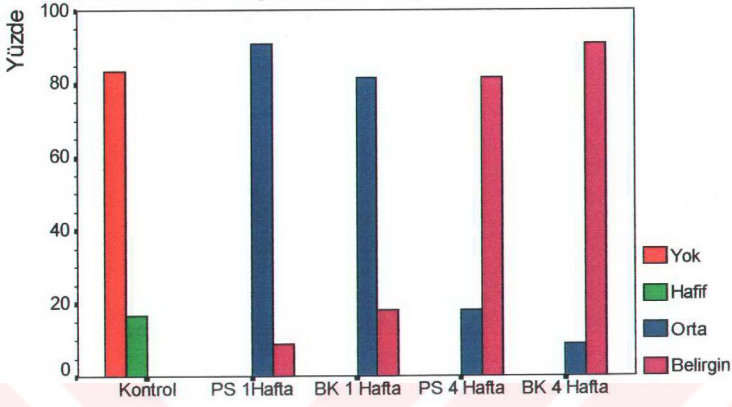
Enflamatuar hücre infiltrasyonu açısından 1 hafta potasyum sorbat uygulanan grup ile 1 hafta benzalkonyum klorid uygulanan grup ve 4 hafta potasyum sorbat uygulanan grup ile 4 hafta benzalkonyum klorid uygulanan grup arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmadı. Ancak 1 hafta ve 4 hafta benzalkonyum klorid uygulanan gruplar ve 1 hafta ve 4 hafta potasyum sorbat uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ( $p<0.0063$ ).



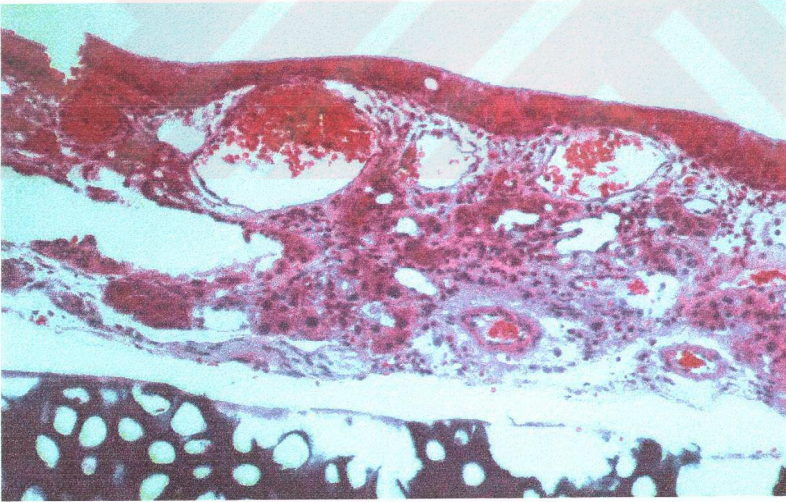
Grafik 2: Gruplarda izlenen enflamatuar hücre infiltrasyonunun görülme sıklığı ve şiddeti.

Yapılan ışık mikroskopik incelemede dikkat çeken bir bulgu da prezervatif uygulanan gruplarda burun mukozasındaki vasküler yapılarıdaki artışıdır (Grafik 3). Prezervatif madde uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ).

## Damarsal Yapılarda Artış



Grafik 3: Gruplarda izlenen damarsal yapılardaki değişimin oranı ve şiddeti.

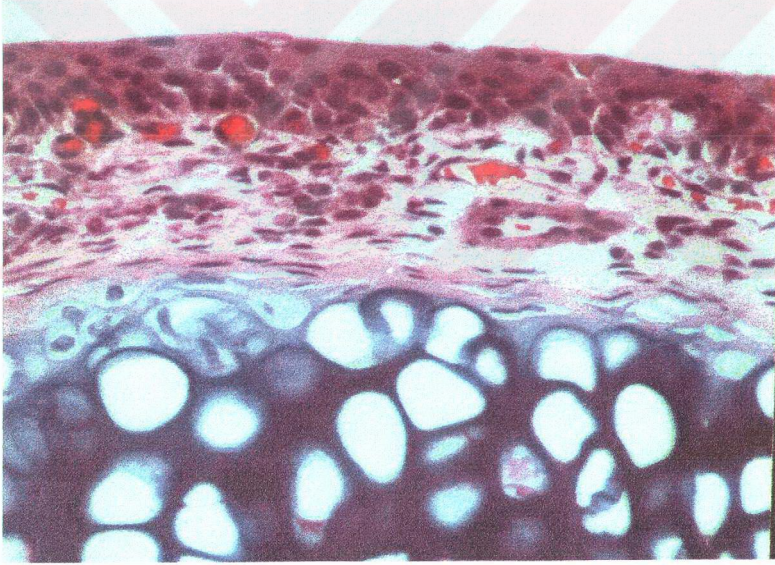


Resim 12. 4 hafta potasyum sorbat uygulanmış nazal mukozadaki vasküler yapılarda artış, doku ödemi ve intraepitelial gland izleniyor (H.E. x100).

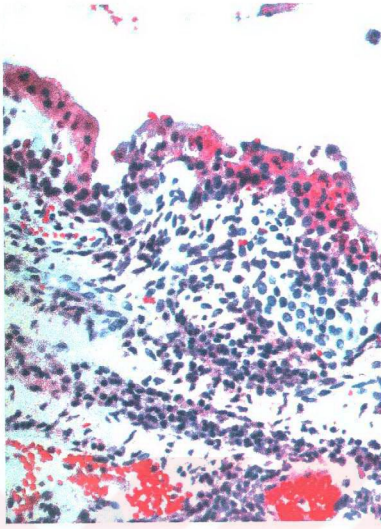


Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında; tıpkı enflamatuar hücre infiltrasyonunda olduğu gibi prezervatif maddelerin birbirinden 1 haftalık ve 4 haftalık kullanımları sonucunda nazal mukozada meydana getirdikleri damarsal yapılarıdaki değişikliklerin istatistiksel olarak farklı olmadığı ancak her iki prezervatifin de 4 hafta kullanımı ile 1 hafta kullanımları sonucu oluşan vasküler değişiklikler ve derecelerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ( $p < 0.0063$ ).

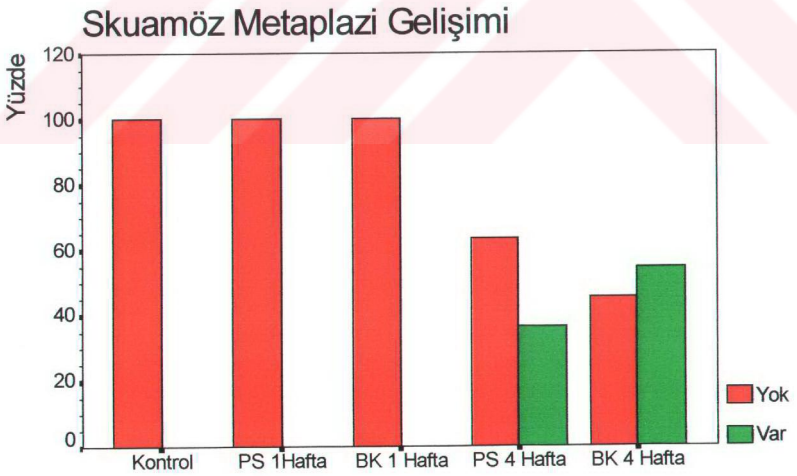
İncelemelerde kaydedilen diğer önemli bulgu nazal mukozada skuamöz metaplazi ve intraepitelial gland gelişimiydi. İntraepitelial gland gelişimi skuamöz metaplazinin bir varyasyonu olarak kabul edilebilir. 1 hafta benzalkonyum klorid uygulanan grupta bir ölçüde izlenen intraepitelial gland gelişimi dışında skuamöz metaplazi ve intraepitelial gland gelişimi yalnızca 4 hafta prezervatif madde uygulanan gruplarda tespit edildi (Grafik 4 ve 5).



Resim 13. 4 hafta potasyum sorbat uygulanmış nazal mukozada izlenen skuamöz metaplazi (H.E. x200).

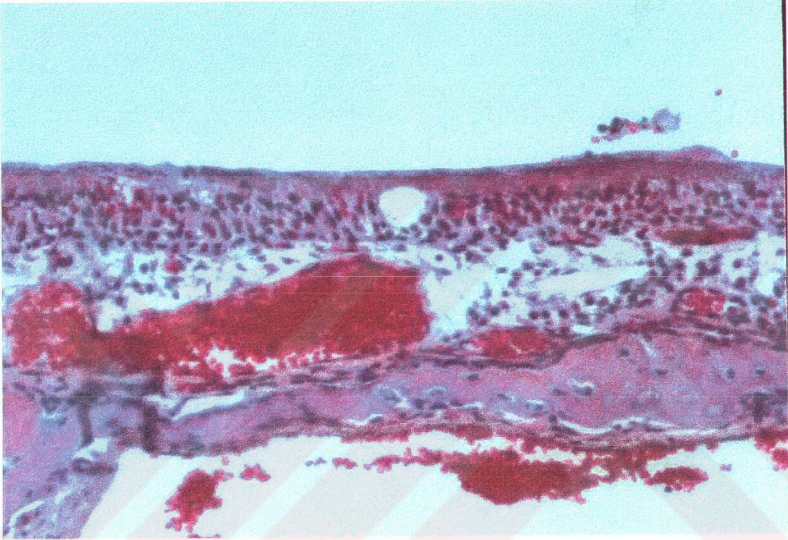


Resim 14. 4 hafta benzalkonyum klorid uygulanmış nazal mukozada izlenen skuamöz metaplazi (H.E. x200).



Grafik 4: Gruplarda izlenen skuamöz metaplazi olguları

Yapılan değerlendirmede kısa ve uzun dđnem prezervatif solũsyon uygulamaları arasında skuamđz metaplazi ve intraepitelial gland gelişimi açısından farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). 4 haftalık prezervatif uygulanan iki grup arasında ayrıca yapılan değerlendirmede benzalkonyum klorid ve potasyum sorbat kullanılan gruplar arasında bu parametreler bakımından farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ( $p>0.05$ ).

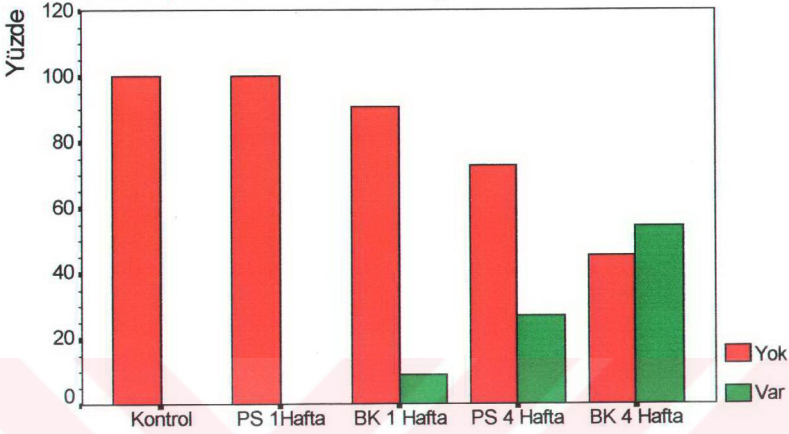


Resim 15. 4 hafta benzalkonyum klorid uygulanan nazal mukozada gelişen bir intraepitelial gland (H.E. x 200).

Bulguları kısaca değerlendirmek gerekirse tđm parametrelerde potasyum sorbat ve benzalkonyum kloridin oluşturdukları etkiler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla beraber gerek 1 hafta gerekse 4 hafta benzalkonyum klorid uyguladığımız gruplarda etkilenme şiddetinin daha fazla olduğunu sđyleyebiliriz. Her iki prezervatif madde için de geçerli olmak üzere uygulanma sũreleri 1 haftadan 4 haftaya çıkınca yukarıda belirtilen tđm parametrelerde etkilenmenin daha fazla olduğu tespit edildi.



## Intraepitelial Gland Gelişimi

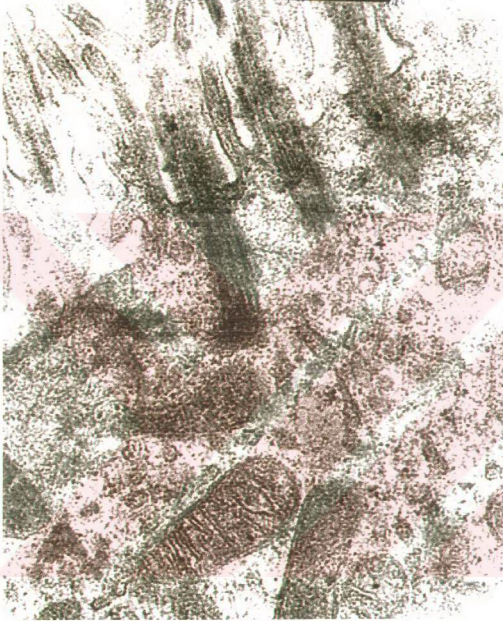


Grafik 5: İntraepitelial gland gelişiminin gruplara göre dağılımı.

### Transmisyon Elektron Mikroskobu İle Yapılan Değerlendirme

Transmisyon elektron mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nazal respiratuar epitelde hücre düzeyinde ultrastrüktürel olarak nükleus, granüllü endoplazmik retikulum vs gibi organellerde küçük farklılıklar izlense de bunlar örnekler arasındaki kabul edilebilir küçük farklılıklar olarak değerlendirildi. Gerek potasyum sorbat gerekse benzalkonyum kloridin 1 hafta boyunca uygulandığı gruplarda ultrastrüktürel olarak göze çarpan bir patolojiye rastlanmadı. Ancak özellikle benzalkonyum klorid uygulanan grupta daha fazla olmak üzere her iki prezervatifin de 4 hafta uygulandığı gruplarda benzer şekilde hücrelerde değişik boyutlarda çok sayıda sitoplazmik vakuol ve bazı hücrelerde silialı epitelin hemen altındaki yüzeysel sitoplazmik alanda mitokondrilerde şişme dikkat çekti. Vakuolleşme sürecine girmiş çok sayıda düz endoplazmik retikulumun gözlenmesi sitoplazmada izlenen bu vakuol artışının düz endoplazmik retikulumun dejenerasyonu sonrasında geliştiğini düşündürdü. Kontrol grubu ile prezervatif madde uygulanan gruplar karşılaştırıldığında dikkat çeken bir özellik de hücre içi fibriler elemanlardaki artış oldu. Bu artışın 4 hafta prezervatif solüsyon uygulanan iki grupta daha fazla olduğu gözlemlendi. Genelde prezervatif solüsyon uygulanan tüm gruplarda silialı epitelin korunmuş olduğu görülse de 4 hafta benzalkonyum klorid uygulanan grupta daha fazla olmak üzere 4 hafta prezervatif

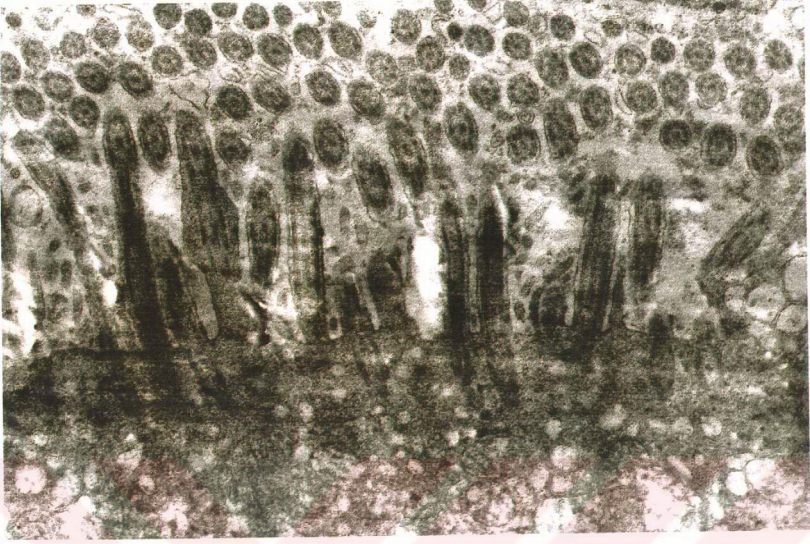
uygulanan iki grupta da yer yer silia kaybı ve sadece mikrovillus ihtiva eden alanlar gözlemlendi. 4 hafta prezervatif uygulanan gruplarda ışık mikroskopunda da gözlenen skuamöz metaplazi transmisyon elektron mikroskobu ile yapılan incelemede de gözlemlendi. 4 hafta benzalkonyum klorid kullanılan grupta bazı örneklerde sitoplazmanın hücre yüzeyine protrude olduğu gözlemlendi. Bu durum hücre dejenerasyonunun başladığının bir göstergesi olarak kabul edildi.



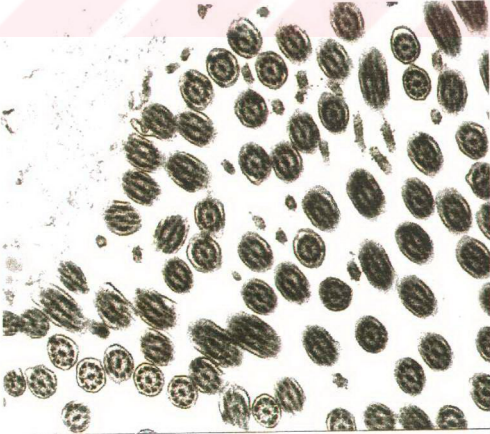
Resim 16. 1 hafta potasyum sorbat uygulanan bir sıcanın nazal mukozasının elektron mikroskopik görüntüsü. Bazal cismin hemen altında mitokondri kümeleşmesi izleniyor (x28 000).

Tüm gruplarda izlenmekle beraber özellikle potasyum sorbat uygulanan ve özellikle de 4 hafta boyunca potasyum sorbat uygulanan grupta daha belirgin olmak üzere siliaları çevreleyen trilaminer membranda dejenerasyon ve yer yer silialarda füzyon dikkat çekici bir bulgu olarak kaydedildi.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diğer tüm gruplarda goblet hücreleri sayısal olarak azalmış bulundu. Kontrol grubu ile birlikte tüm gruplarda siliaların 9+2 konfigürasyonlarında ve radial uzantılarında herhangi bir etkilenmenin olmadığı izlendi.

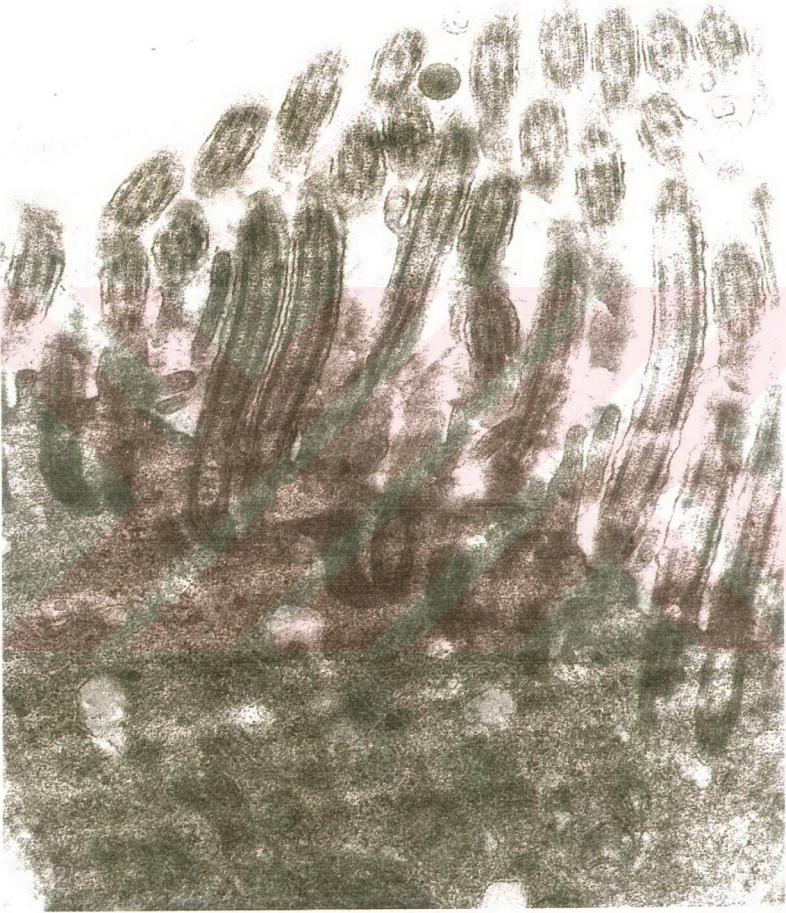


Resim 17. 4 hafta süreyle potasyum sorbat uygulanan örnekte silialardaki kümeleşme ve bazı siliaların birbirine yapıştığı izleniyor (x13 000).

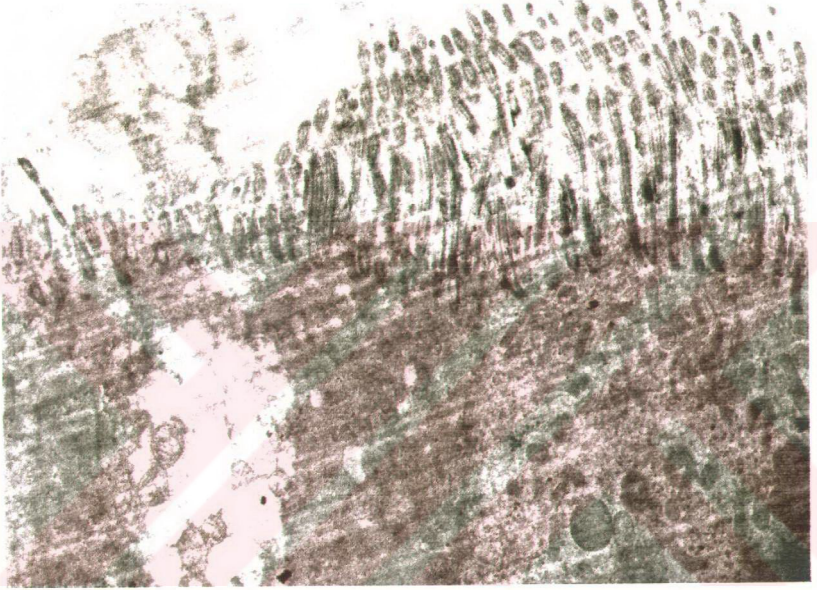


Resim 18. Sağlıklı bir nazal mukozada trileveler membranları intakt silialar (X17 000).



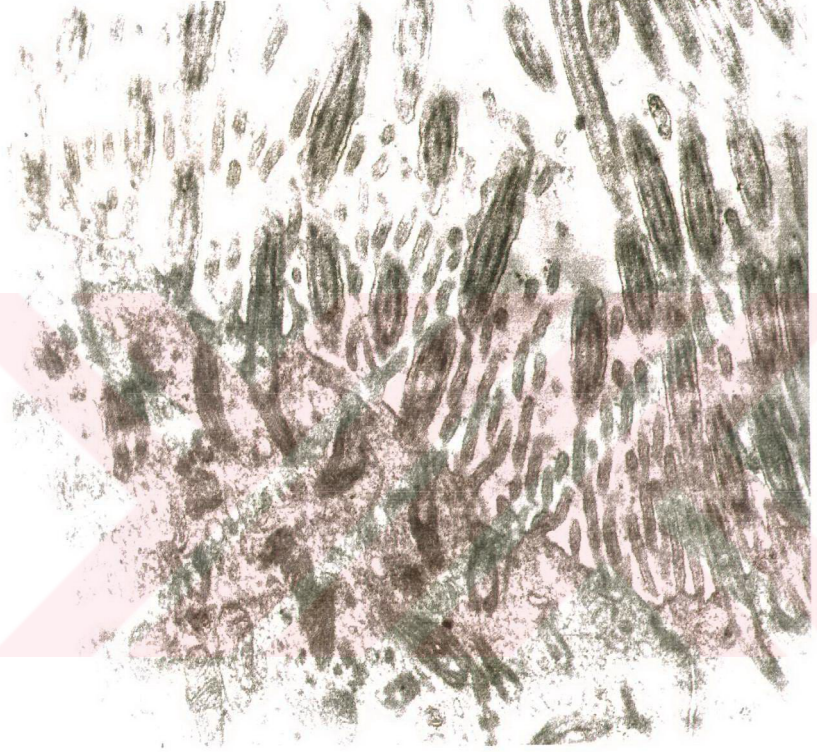


Resim 19. 1 hafta potasyum sorbat uygulanan bir sıçanın nazal mukozasının elektron mikroskobik görüntüsü. Herhangi bir patoloji izlenmiyor ( x17 000).

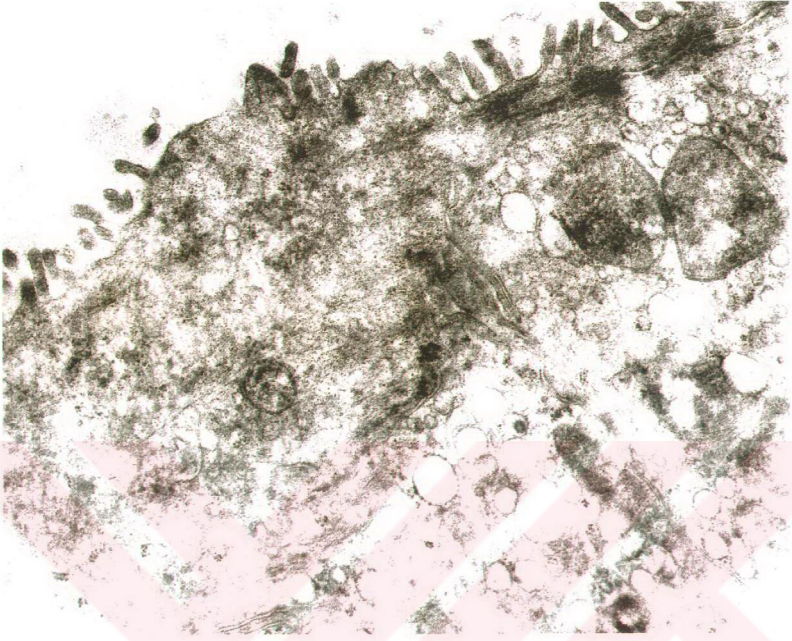


Resim 20. 1 hafta potasyum sorbat uygulanmış bir nazal mukozada sağlıklı silialar ve bazal cisimleri ve onların da çevresinde mitokondriler izleniyor. Solda goblet hücresi ve yüzeye doğru yaptığı salgı izleniyor (x3600).





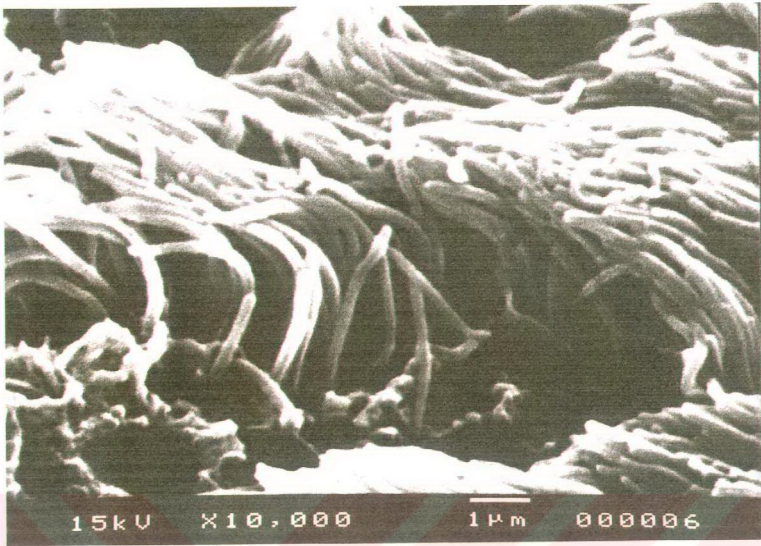
Resim 21. 1 hafta potasyum sorbat uygulanan bir siçanın nazal mukozası. Sağlıklı silia ve mikrovillus yapısı yanı sıra sitoplazmada mitokondrilerin varlığı siliaların fonksiyonlarını kaybetmediğinin bir kanıtı (x13 000).



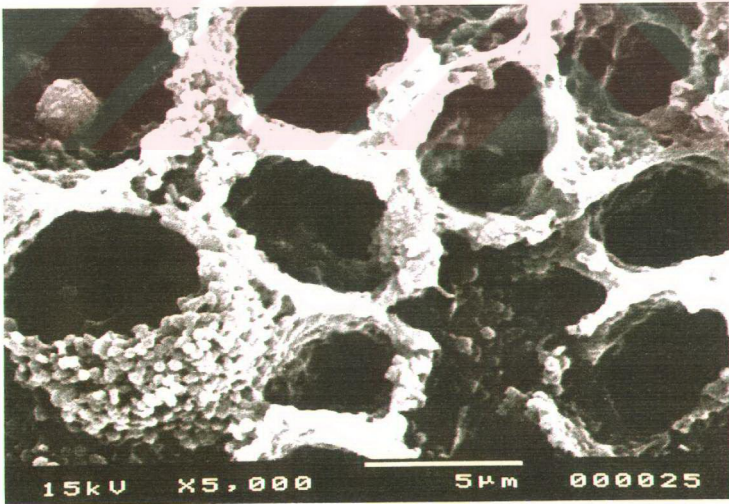
Resim 22. 4 hafta benzalkonyum klorid uygulanmış bir sıcanın nazal mukozasında silia kaybı izleniyor. Mikrovillus yapısı sağlam. Sitoplazmada yoğun vakuoller izleniyor (x13 000).

### Scanning Elektron Mikroskobu İle Yapılan Değerlendirme

Scaning elektron mikroskobu ile yapılan değerlendirmede 1 hafta süreyle benzalkonyum klorid uygulanan grupta burun mukozasında birkaç örnekte küçük alanlar halinde silia kaybı izlenmekle beraber genelde doku bütünlüğünün korunmuş olduğu gözlemlendi. Bu grupta göze çarpan en önemli bulgu silialardaki kümeleşme eğilimidir. Bu kümeleşmeye rağmen siliaların koordine bir şekilde aynı yöne eğilim gösterdikleri izlendi. 1 hafta potasyum sorbat uygulanan grupta ise örneklerde hiçbir alanda silia kaybı gözlemlenmedi. Bu grupta silialardaki kümeleşme eğiliminin daha belirgin olduğu dikkat çekti.

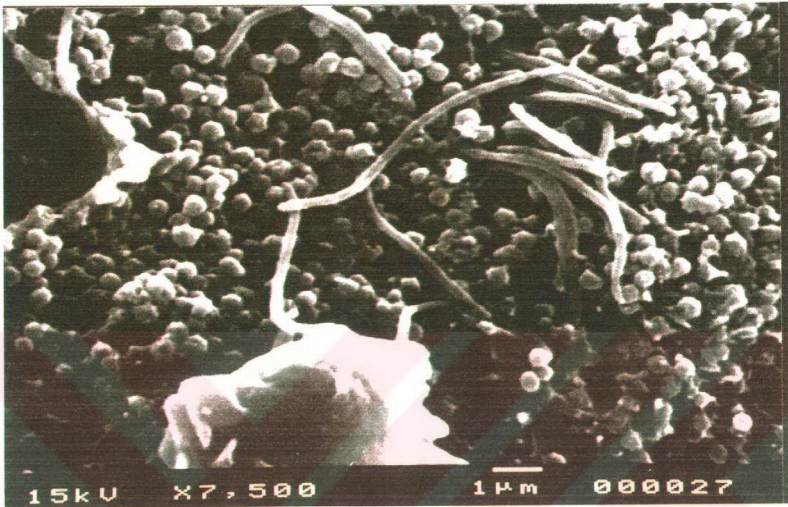


Resim 23. Kontrol grubundan bir scanning elektron mikroskopik görüntü (x10 000).



Resim 24. 4 hafta benzalkonyum klorid uygulanan bir örnekte izlenen goblet hücrelerindeki dejenerasyon (x5 000).

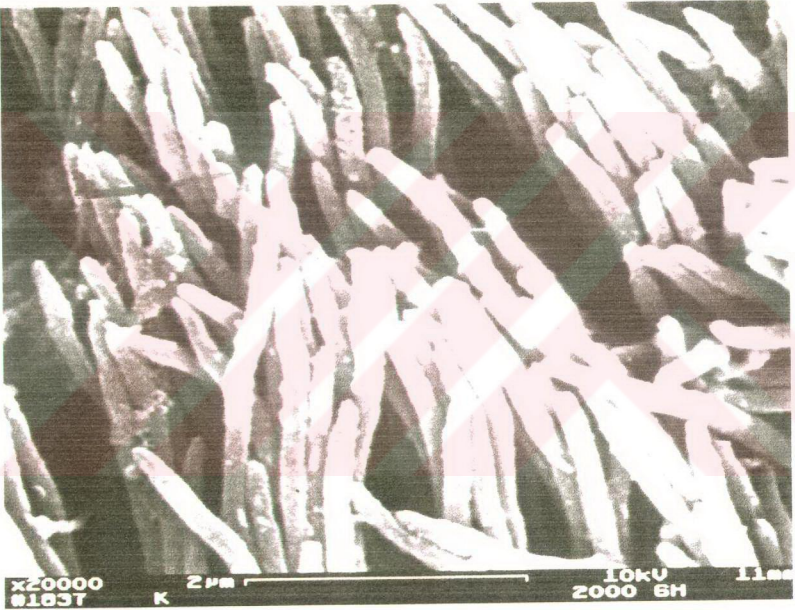




Resim 25. 4 hafta benzalkonyum klorid uygulanan bir örnekte bir alanda silia kaybı izleniyor (x7 500).

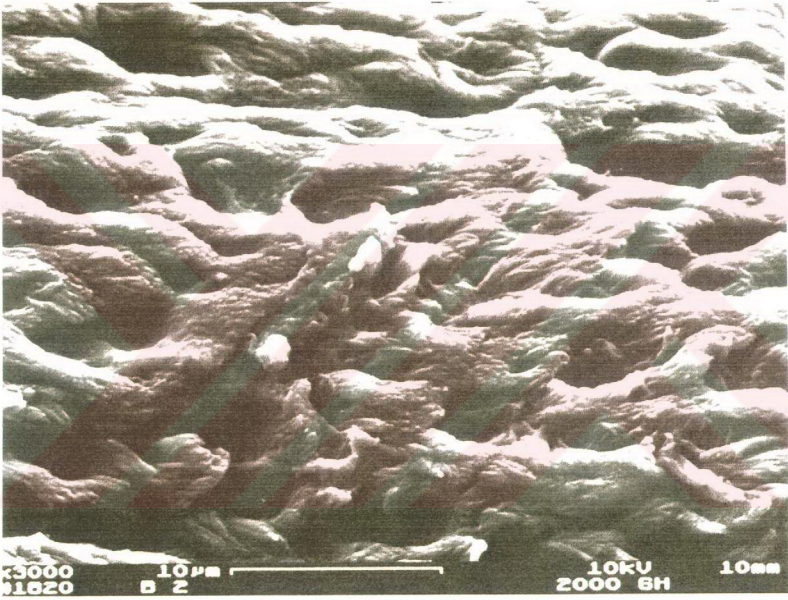
4 hafta boyunca benzalkonyum klorid uygulanan grupta silia kaybı izlenen alanlar daha sık karşımıza çıktı ve daha geniş olarak izlendi. Bu alanların ışık mikroskobu ile yapılan incelemede de belirtilen skuamöz metaplazi gelişmiş alanlar olduğu düşünüldü. Nadiren de olsa bazı alanlarda goblet hücrelerinin burun boşluğuna bakan duvarlarının patlayarak canlılığını yitirdiği gözlemlendi. Doku geneline bakıldığında silialı epitelin mevcudiyetini sürdürdüğü ancak silialarda yoğun kümeleşmeler yer yer silialar arasında yapışıklıklar izlendi. Bu değişikliklere rağmen silialar yine koordine bir şekilde aynı yöne eğilim göstermekteydi.

4 hafta süreyle potasyum sorbat uygulanan grupta da benzer şekilde silia kaybı gösteren alanlar, silialarda yoğun kümeleşme ve yapışıklıklar izlendi. Yine silialar koordine bir şekilde aynı yöne eğilim gösteriyordu. Bu grupta denatüre goblet hücre grupları hiç karşımıza çıkmadı.



Resim 26. kontrol grubundan elde edilen mukozada sağlıklı siliaların görünümü (x20000).





Resim 27. 4 hafta benzalkonyum klorid uygulanan burun mukozasında silialar arasında sıkı gruplaşma ve yer yer yapışmalar izleniyor. Siliaların tümü aynı yöne eğilim göstermekte (x3000).



Resim 28. 4 hafta boyunca burnuna benzalkonyum klorid uygulanan bir siçanın burun mukozasında skuamöz metaplazi gelişen bir alan izleniyor (x500).

## TARTIŞMA

Mukosilier klirens solunum yolunun temel savunma mekanizmasıdır ve reolojik özellik olarak mukus taşıyıcı bir bant olarak kabul edilir. Siliaların ve silia fonksiyonlarının sağlıklı olması mukosilier klirensin devamı için şarttır. Bu defans mekanizmasının uygulanan tedavilerle tahrip edilmemesi gerekir.

Nazal akuöz ve süspansiyon şeklinde pek çok ilaç piyasada tıbbın hizmetine sunulmuştur.

Mukozal püskürtme sistemleri çok sayıda doz içeren aygıtlar olduklarından sıklıkla mikrobiyal üremeyi engellemek için prezervatif maddelere ihtiyaç gösterirler. Kullanılan bu maddelere karşı hem alerji geliştiğine hem de toksik etkilerinin bulunduğuna ilişkin raporlar mevcuttur (14,16). Bu şekilde rinitis medikamentoza, yanma, kuruma, iritasyon, epistaksis gibi bu maddelerin yol açtığı pek çok lokal yan etki bildirilmiştir. Bu lokal yan etkilere formülasyonlarda kullanılan aktif maddeler yol açıyor olabilir. Ancak bu etkilere yapılan pek çok araştırmada rapor edildiği üzere sıklıkla kullanılan prezervatif maddeler sebep olmaktadır (19).

Bu çalışmada topikal uygulanan burun damlalarında prezervatif madde olarak sıkça kullanılan benzalkonyum klorid ve potasyum sorbatın insan solunum epiteline olan etkileri araştırıldı.

Burun damlalarında prezervatif madde olarak en fazla benzalkonyum klorid kullanılmaktadır (13). Benzalkonyum kloridin burun içindeki solunum epiteli üzerine olumsuz etkilerini gösteren pek çok çalışma mevcuttur. Bunun yanısıra benzalkonyum kloridin aynı dokular üzerine herhangi bir zararlı etkiye yol açmadığını bildirir yayınlar da vardır. Birbiri ile çelişen bu çalışmalar irdelendiğinde zararlı etkilerin belirgin şekilde gözlemlendiği çalışmaların in vitro modellerde yapıldığı, dokularda belirgin zararlı etkilerin izlenmediği çalışmaların ise in vivo modellerde gerçekleştirildiği dikkat çekmektedir (21).

Bulgulardaki çelişkiler ve benzalkonyum kloridin toksik etkilerinin olduğunu bildirir çalışmaların çoğunlukta olması son zamanlarda prezervatif madde konusunda yeni arayışlara yol açmış ve bunların sonucunda da potasyum sorbat benzalkonyum kloridin yerini almaya başlamıştır.

Van de Donk ve ark.(23-25) tarafından % 0.05 EDTA ile birlikte % 0.1 oranında benzalkonyum klorid solüsyonu ile lipofilik bir prezervatif madde olan klorokresolün ve cıvalı bir prezervatif madde olan timerosalün silier vuru frekansına olan etkileri karşılaştırılmak üzere in vitro olarak araştırılmıştır. Benzalkonyum klorid solüsyonu ile 20



dk içerisinde vuru frekansının %30 oranında azaldığı tespit edilmiş ve daha uzun süre etkileşimlerde vuru frekansında azalmanın ve silia üzerine toksik etkilerin daha da belirginleştiği gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre vuru frekansı süresinin yarı yarıya azalmasının 1.13 saatte ve vuru frekansının tamamen kaybının da 2 saatin üzerinde geliştiği tespit edilmiştir. Cıvalı ve lipofilik bileşiklerin benzalkonyum kloridden daha fazla toksik etkiye sahip olduklarını rapor eden Van de Donk ve ark. % 0.01 oranında kullanılacak benzalkonyum klorid ve %0.05 oranındaki EDTA yı bu konsantrasyonlarda diğer lipofilik ve cıvalı ajanlara göre daha az toksik olmaları nedeniyle tavsiye etmiştir.

Joki ve ark.(26) İn vitro olarak benzalkonyum kloridin kobay ve sıçanların trakeal epitelindeki silier vuru frekansına olan etkilerini araştırmışlar ve silier vuru frekansındaki azalmanın uygulanan benzalkonyum klorid bileşiğinin konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olduğunu rapor etmişlerdir. Sıçan trakeasından hazırlanan doku kültürlerinde benzalkonyum kloridin % 0.01 lik konsantrasyonunun silier aktiviteyi 5 dakika içinde durduğunu, % 0.0025 gibi düşük konsantrasyonlarda bu sürenin 30 dakikaya çıktığını bildirmişlerdir.

Kobay trakeasından hazırlanan doku kültürlerinde ise benzalkonyum kloridin % 0.0025 gibi düşük konsantrasyonlarda silier vuru frekansında 60 dakika içinde % 27 lik bir azalmaya sebep olduğu tespit edilmiş ve % 0.05 gibi biraz daha yüksek konsantrasyonlarda silier aktivitenin 40 dakika içinde irreversible olarak durduğu bildirilmiştir. Bu in vitro çalışma sonunda ise benzalkonyum kloridin nazal damlalarda kullanılan diğer koruyucu maddelerden daha fazla toksik etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir.

Stanly ve ark.(27) sağlıklı gönüllülerin alt konkalarından aldığı örnekler ile hazırladığı doku kültürleri üzerinde benzalkonyum kloridin doz bağımlı siliostatik cevaplarını araştırarak maksimum siliostatik cevabın % 0.01 den % 0.02 ye kadar değişen konsantrasyonlarda 5 dakika içinde gözlendiğini ve % 0.002 lik konsantrasyonda ise siliostatik cevabın 60 dakika içinde geliştiğini bildirmiştir. % 0.0008 gibi oldukça düşük konsantrasyonlarda dahi 60 dakika içinde sillier vuru frekansının kontrol grubuna göre % 57 oranında azaldığını bildirilmiştir. Bu veriler in vitro olarak benzalkonyum kloridin burun içindeki silialı solunum yolu epiteline karşı toksik olduğunu kesin olarak göstermektedir.

Son zamanlarda Hofmann ve ark.(28) tarafından yapılan bir çalışmada in vitro olarak insan burun mukozasında benzalkonyum klorid içeren 4 nazal sprey ile benzalkonyum klorid içermeyen bir kortikosteroid preparatının silier vuru frekansına etkileri araştırılmış ve sonuçta benzalkonyum klorid içeren 4 nazal spreyden üçünün silier vuru frekansını dramatik bir şekilde azalttığı veya irreversible bir şekilde durdurduğu, benzalkonyum klorid

içermeyen nazal spreyin ise hafif ve geçici bir vuru frekansı azalmasına yol açtığı rapor edilmiştir. Bu araştırmacı aynı zamanda benzalkonyum kloridi tek başına burun mukozasına uygulayarak silier vuru frekansının bu uygulama ile irreversible olarak durduğunu göstermiştir.

Benzalkonyum kloridin insan nazal mukozası üzerine kısa dönem etkileri McMahon ve ark.(29) tarafından araştırılmıştır. Bu in vivo çalışmada 34 sağlıklı gönüllüde sakarin klirens testi uygulanmış ve 10 dakika süreyle % 0.02 oranındaki benzalkonyum klorid solüsyonu uygulamasından sonra ortalama klirens zamanında belirgin bir uzama izlenmiştir. Salin solüsyonu verildiğinde ise aksine klirens zamanında bir kısalma izlenmiştir. Bu tek dozla yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlara zıt olarak iki hafta boyunca günde iki kez salin solüsyonu, kortikosteroid ve benzalkonyum klorid karışımı ve tek başına benzalkonyum klorid solüsyonlarının uygulanmaları sonrasında elde edilen klirens zamanlarının istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir.

Graf ve Hallen (30,31) benzalkonyum klorid içeren burun damlalarını uzun süre kullananlarda mukozal şişme oluştuğunu rapor etmişlerdir.

Kuboyama ve ark.(32) sıçanlarda burun içine benzalkonyum klorid uygulanmasının intranasal lezyonların gelişmesine yol açtığını göstermişlerdir. % 0.01, % 0.05 ve % 0.1 lik konsantrasyonlardaki benzalkonyum klorid solüsyonları günde 8 kez uyguladıktan sonra yüksek konsantrasyon uygulanan gruplarda daha belirgin olmak üzere epitelyal dökülme, dejenerasyon, ödem veya nötrofilik hücre infiltrasyonu gözlendiğini rapor etmişlerdir.

Berg ve ark.(33) benzalkonyum kloridin in vivo nazal mukoza için potansiyel bir toksik ajan olduğunu göstermişlerdir. Çalışmalarında günde iki kez % 0.031 ve % 0.022 konsantrasyonlarında benzalkonyum klorid içeren iki nazal steroid sprey ve benzalkonyum klorid içermeyen bir nazal steroid sprey kullanılmıştır. Sonuçta burnun anterior kısımlarından alınan örneklerde benzalkonyum klorid kullanılan grupta skuamoz hücre metaplazisi, epitelyal hücre boylarında kısalma, pleomorfizm, silia yoğunluğunda azalma ve goblet hücrelerinde azalma tespit edilirken diğer grupta ve salin solüsyonu uygulanan kontrol grubunda patolojik bir değişikliğe rastlanmamıştır.

Ainge ve ark.(34) maymunlarda 28 gün boyunca günde 8 kez 1 mL uygulanan %0.02 oranında benzalkonyum klorid içeren kortikosteroidli preparatın maymun burnundaki silialı solunum yolu epiteli üzerine olan etkileri ile % 0.01 konsantrasyonda benzalkonyum klorid içeren bir kortikosteroidli preparatın aynı şekilde sıçan solunum yolu epiteline olan etkilerini % 5 glukoz solüsyonu uyguladıkları kontrol grubu ile karşılaştırmışlardır. Uygulama periyodu sonrasında nazal mukozadan alınan örneklerde silia sayımı yapılmış ve



bu örnekler hem scanning hemde transmisyon elektron mikroskopları ile incelenmiştir. Sonuçta silialı hücre sayıları arasında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı rapor edilmiştir. Scanning elektron mikroskopik görüntüler tüm grupların sağlıklı silialı epitel ile kaplı olduğunu göstermiştir, aynı şekilde transmisyon elektron mikroskopu ile yapılan inceleme sonucunda da ultrastrüktürel olarak anlamlı bir patolojinin olmadığı bildirilmiştir. Steinsvag ve ark.(35) benzalkonyum klorid içeren nazal topikal steroidlerin insan burun mukozasında in vitro olarak destrüktif etkisi olduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından adenoid dokudan hazırlanan doku kültürlerine % 0.031 ve % 0.022 oranlarında benzalkonyum klorid içeren kortikosteroidli nazal spreyler, sadece % 0.02 konsantrasyonda benzalkonyum klorid içeren bir sprey ve benzalkonyum klorid içermeyen kortikosteroidli burun spreyleri 10 gün boyunca günde bir kez uygulanmıştır. Sonuçlar inverted faz mikroskobu ve scanning elektron mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Benzalkonyum klorid uygulanan gruplarda ilk izlenen bulgu silia vurusundaki azalma olmuş ve 10 günlük uygulama sonrasında benzalkonyum klorid konsantrasyonu ile ilişkili bir şekilde sağlıklı epitelin derece derece granüllü ve düzensiz bir epitele dönüştüğü, var olan siliaların da hareketlerini kaybettiği gözlenmiştir. Buna zıt olarak benzalkonyum klorid uygulanmayan gurupta silia hareketlerinde ve morfolojik yapıda bir değişim izlenmemiştir. Bu bulgular in vitro ortamda benzalkonyum kloridin insan solunum yolu mukozası üzerine toksik etkiye sahip olduğu hipotezini desteklemektedir.

Berg ve ark.(36) yaptıkları başka bir araştırmada benzalkonyum klorid içeren nazal spreyler ile tedavinin in vitro olarak insan solunum yolu mukozasına olan etkilerinin uygulama süresi ve uygulanan doz ile ilişkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada adenoid doku kültürlerine 14 gün boyunca % 0.015 oranında benzalkonyum klorid ihtiva eden oxymetazolin sprey 1, 3, 10 ve 30 dakikalık süreler ile uygulanmış ve yine % 0.015 oranında benzalkonyum klorid içeren % 30, % 10 ve % 3 oranlarında oxymetazolin içeren spreyler de 10 ar dakika süreyle ayrı gruplara uygulanmıştır. Her deney grubu silier vuru frekansı ile fonksiyonel olarak ve elektron mikroskobu ile morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak 30 dakika süreyle solüsyona tabii tutulan grubun 3 gün içinde canlılığını yitirdiği gözlenmiştir. Benzer şekilde doz ve süre ile doku hasarlanmasının aynı oranda arttığı tespit edilmiştir.

Bu bulgulara zıt olarak Braat ve arkadaşları (21) yaptıkları in vivo çift kör çalışmada 22 alerjik rinitli hastayı gruplara ayırarak 6 hafta boyunca sırasıyla % 0.02 oranında benzalkonyum klorid içeren kortikosteroid sprey, % 0.02 konsantrasyonunda sadece benzalkonyum klorid içeren solüsyon ve placebo solüsyonu uygulamışlardır. Sonuçlar

fonksiyonel olarak ve morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Fonksiyonel değerlendirmede tedavi öncesi, tedavi sırasında ve tedavi sonrasında sakkarin transport testi uygulanmıştır. Morfolojik olarak değerlendirmede ışık ve elektron mikroskopları kullanılmıştır. Sakkarin testinde tüm gruplar için anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. Morfolojik değerlendirmede ışık mikroskobu ile yapılan incelemede tüm gruplarda sağlıklı epitel izlenmiştir. Silia yoğunluğu örnekler arasında farklılık göstermekle birlikte bunun tedavi ile ilişkisiz olduğu belirtilmiştir. Yine çeşitli boyutlarda ödem ve enflamasyon gözlenmekle beraber gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır.

Transmisyon elektron mikroskobu ile yapılan incelemede pek çok organelde önemli olmayan küçük değişiklikler saptanmıştır. Bazı hücrelerde mitokondrial şişmeler, ara ara aşırı elektrondan yoğun mitokondriyel ve çeşitli boyutlarda pek çok sitoplazmik vakuoller saptanmıştır. Golgi aparatları örnekler arasında fazla farklılık göstermemekle beraber en sık gözlenen organel olarak dikkat çekmiştir.

Silialar tüm biyopsi örneklerinde benzer şekilde gözlenmiş ve tüm gruplardaki hastalardan alınan örneklerde siliaların dış zarlarının sağlam olduğu gözlenmiştir.

Bu bulgularla Braat ve ark. benzalkonyum kloridin in vitro olarak gösterilen toksik etkilerinin in vivo ortamda izlenmediği sonucuna varmışlardır.

Batts ve ark.(37) kurbağa damağının mukosilier transportunun araştırılması için bir model geliştirmiş ve bu modelde benzalkonyum kloridin kötü tolere edildiğini göstermiştir. Bu modelde 10 dakikalık bir zaman diliminde benzalkonyum kloridli solüsyon damağa uygulanmış ve sonra 200. dakikaya kadar beklenerek damak uzunluğu boyunca grafit partiküllerin transportunun hızı ölçülmüştür. Benzalkonyum kloridin bir veya iki uygulamadan sonra transportu irreversible olarak engellediği gözlenmiştir (9).

Braga ve ark.(38) % 0.01 oranında benzalkonyum klorid içeren solüsyon ile kurbağa damağı modeli kullanarak yaptığı ex vivo çalışmada mukosilier transport zamanını ölçmüş aynı zamanda da scanning elektron mikroskobu ile dokuyu değerlendirmişlerdir. Sonuçta mukosilier transport zamanında anlamlı bir değişikliğin olmadığını tespit etmişlerdir. Scanning elektron mikroskobu ile yaptığı incelemede de siliaların sağlıklı olduğu bildirilmiştir. Belirttiğim bu son iki çalışmanın önemi diğer in vitro modellerden farklı olarak kurbağa damağı sisteminin mukus ile korunmuş bir silialı epitele sahip olması ve bu sebep ile in vivo çalışmalara ortam şartları bakımından en yakın in vitro çalışma olmasıdır.

Cho ve ark.(1) geçtiğimiz aylarda yaptıkları bir çalışmada % 0.1 ve % 5 oranındaki potasyum sorbat solüsyonları ile % 0.01 ve % 0.1 oranındaki benzalkonyum klorid solüsyonlarını sıçanların burun mukozasına günde iki kez 7mL lik dozlar halinde 1, 2 ve 4

hafta boyunca uygulamış ve sonrasında yaptıkları ışık mikroskopik değerlendirmede potasyum sorbatın da benzalkonyum klorid gibi nazal mukoza üzerine toksik etkilerinin olduğunu rapor etmişlerdir.

Bizim gerçekleştirdiğimiz in vivo çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar her iki prezervatif maddenin nazal mukoza üzerinde potansiyel toksik etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu prezervatif maddelerin 1 hafta gibi kısa süreli kullanımlarında dahi mukosilier fonksiyonlara yansımayan ancak ultrastrüktürel incelemelerde tespit edilebilen toksik etkileri gözlemlendi. Gerek 1 hafta gerekse 4 hafta boyunca benzalkonyum klorid uygulanan gruplarda izlenen patolojik değişiklikler potasyum sorbat uygulanan gruplara göre biraz daha belirgindi ve daha fazla örnekte gözlemlendi. Ancak yapılan istatistiksel analizler meydana gelen zararlı etkiler karşılaştırıldığında potasyum sorbatın benzalkonyum kloridden farklı olmadığını gösterdi.

İn vivo olarak yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar benzalkonyum kloridin zararsız olabileceği anlamına gelmemelidir çünkü burun içi solunum yolu epiteli in vivo ortamda benzalkonyum kloridin zararlı etkilerine karşı daha dirençlidir. Bunun sebebi mukus ve perisilier sıvının laboratuvar şartlarında doğal ortamdakinden az ya da çok farklı olması, doğal ortamda uygulanan maddenin mukus tarafından dilüe edilmesi, mukosilier transportun bu maddeleri ortamdan uzaklaştırması, mukusun bir bariyer gibi epiteli örterek koruması ve doğal ortamda epitel yenilenmesinin devam ediyor olması şeklinde sıralanabilir. Bütün bunlar kültür ortamında mevcut değildir.

Sağlıklı bir burun yaklaşık 0.4 ml mukus içerir (2,4,9). Burun spreylelerinin gerekli olduğu hastalıklarda örneğin bir allerjik rinitte bu miktar artar dolayısı ile rinitli burunlarda dilüsyon daha fazla olacak ve benzalkonyum kloridin yol açacağı hasar daha iyi engellenecektir. Bütün bunlara ek olarak benzalkonyum kloridin protein ve diğer organik materyaller ile inaktive olduğunu hatırlarsak in vivo ortamda sürekli üretilen mukusun bu yönüyle de siliaları koruduğunu söyleyebiliriz.

Bizim çalışmamızda da bazı alanlarda patolojik değişiklikler izlense de burun içindeki titrekt tüylü solunum yolu epitelinin tüm gruplarda genelde korunmuş olduğu gözlemlendi. Bunda yukarıda sözünü ettiğimiz in vivo etkenlerin rolü olduğu muhakkaktır. Tüm bu faktörler insanlarda olduğu gibi bir sıçandan diğerine oldukça değişkenlik gösterir (39). Burun salgıları homojen olmayan bir yapıya sahiptir ve bu özellikten dolayı burun salgılarının viskozitesi oldukça değişkendir. Aynı anda burnun çeşitli alanları arasında dahi sekresyon yapı olarak farklılık gösterir (40). Böylece zararlı maddelerin dilüe edilmesi ve dokuya penetrasyonları da bu sebepten değişik oranlarda olacaktır. Mukosilier transport

hızı da burnun çeşitli yerlerinde farklılık gösterir. Bunun sebebi silia vurum frekansının, silia yoğunluğunun, mukus ve silia kalitesinin ve silia uzunluğunun burnun her yerinde aynı olmamasından kaynaklanır. Mukosilier transport hızı alt konkanın hemen ön kısımlarında saatte 1-2 mm/saat iken arka kısımlarında bu hız 8-10 mm/saate çıkar (9). Genellikle azalmış vurum frekansı nedeniyle olan mukostaz, mukozal penetrasyon ile zararlı elemanların hastalığı başlatmasına izin verebilir. Prezervatif madde uyguladığımız sıçanların burun mukozalarında izlediğimiz patolojik değişikliklerin mukozanın tamamının aynı süreçten geçmesine rağmen neden mukozanın her yerini etkilemediğini yukarıda sözünü ettiğimiz özelliklerle açıklayabiliriz.

Sonuç olarak gerek benzalkonyum klorid gerekse de potasyum sorbat solunum yolu epiteli için zararlı etkilere sahiptir. Burun içi solunum yolu epiteli in vivo ortamda bu maddelerin zararlı etkilerine karşı yukarıda saydığımız etmenlerden dolayı daha dirençlidir. Bizim araştırmamız 1 ve 4 haftalık uygulamalar sonrasında yaptığımız incelemelerde bütün direnç mekanizmalarına karşın patolojik değişmelerin geliştiğini ve uzamış uygulamalarda bu zararlı etkilerin daha da belirginleştiğini gösterdi.



## SONUÇ

Her iki maddenin uygulandığı gruplar arasında zararlı etkiler bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmasa da potasyum sorbat uygulanan gruplarda izlenen patolojik değişikliklerin benzalkonyum klorid uygulanan gruplara göre nispeten daha az olması potasyum sorbatın prezervatif madde olarak tercih edilmesinin daha uygun olacağını düşündürmektedir.

Tedavinin etkinliğine hiçbir katkı sağlamayan yalnızca preparatların korunması için kullanılan bu iki prezervatif madde de mümkün olduğunca tercih edilmemelidir. Bunun için zararlı olmayan yeni prezervatif maddelerin bulunması ya da prezervatif maddelere ihtiyaç duymayan yeni aygıtların geliştirilmesi gereklidir.



## ÖZET

### AMAÇ

Bu çalışmada buruna uygulanan topikal formülasyonlarda yaygın olarak kullanılan benzalkonyum klorid ve potasyum sorbatın uzun ve kısa süreli uygulanmaları sonrasında burun içindeki solunum yolu epiteli üzerinde meydana getirebileceği değişiklikleri ışık mikroskobu, transmisyon elektron mikroskobu ve scanning elektron mikroskobu düzeyinde inceleyerek varsa toksik etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

### GEREÇ VE YÖNTEM

Benzalkonyum klorid ve potasyum sorbatın uzun ve kısa dönem kullamlarında olası zararlı etkilerini göstermek için yapılan bu in vivo çalışmada aynı lâboratuarda üretilmiş ve aynı jenerasyondan ağırlıkları 350-450 gr arasında olan 56 sıçan beş gruba bölünerek incelendi.

1.Grup : Günde iki kez her bir burun deliğine 7 mL olmak üzere mikropipet yardımıyla saat 08:00 ve 20:00 da 4 hafta boyunca intranazal % 0,9 NaCl solüsyonu uygulandı.

2.Grup : Günde iki kez her bir burun deliğine 7 mL olmak üzere mikropipet yardımıyla saat 08:00 ve 20:00 da 1 hafta boyunca intranazal % 0,01 oranında benzalkonyum klorid solüsyonu uygulandı.

3.Grup : Günde iki kez her bir burun deliğine 7 mL olmak üzere mikropipet yardımıyla saat 08:00 ve 20:00 da 1 hafta boyunca intranazal % 0,12 oranında potasyum sorbat solüsyonu uygulandı.

4.Grup : Günde iki kez her bir burun deliğine 7 mL olmak üzere mikropipet yardımıyla saat 08:00 ve 20:00 da 4 hafta boyunca intranazal % 0,01 oranında benzalkonyum klorid solüsyonu uygulandı.

5.Grup : Günde iki kez her bir burun deliğine 7 mL olmak üzere mikropipet yardımıyla saat 08:00 ve 20:00 da 4 hafta boyunca intranazal % 0,12 oranında potasyum sorbat solüsyonu uygulandı.

Bir ve dört haftalık uygulamalar sonrasında sıçanlar dekapite edilerek kafa derileri soyuldu ve burun içindeki mukozaya dokunmamaya son derece özen gösterilerek burun boşluğu açığa çıkarıldı. Tüm sıçanlardan standart olarak septumun 1/3 orta ve alt bölgesinden alınan örnekler elektron mikroskobu ve ışık mikroskobu düzeyinde incelenmek üzere hazırlandı.

Işık mikroskobu düzeyinde incelenecek septal mukoza örneğinden hazırlanan preparatlar hematoxilen eozin ile boyandıktan sonra aynı patolog tarafından silia kaybı, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, skuamöz metaplazi, intraepidermal gland gelişimi, vasküler yapılarda artmanın olup olmaması ve subepitelial ödem yönünden incelendi (31). Scanning elektron mikroskopik değerlendirmede Zeiss DSM 982 Gemini elektron mikroskobu kullanıldı. Yapılan yüzey taraması ve değerlendirmenin yanı sıra Agfa Pan AXP 25 marka film kullanılarak kayda değer histopatolojik bulguların fotoğrafı çekildi. Transmisyon elektron mikroskopik çalışmada ise Philips CM 12 transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak ultrastrüktürel değişiklikler incelendi ve Kodak SO 163 marka film kullanılarak kayda değer bulgular fotoğraflandı. Işık mikroskobu ile elde edilen bulgular istatistiksel olarak analiz edildi ve sonuçlar elektron mikroskobu ile elde edilen bulgular ile birlikte değerlendirildi.

İstatistiksel analizlerde anlamlılık derecesi olarak  $\alpha = 0.05$  kabul edildi. İntraepitelial gland gelişimi ve skuamöz metaplazi gelişimi gruplar arasında  $\chi^2$  ile değerlendirildi. Ayrıca gruplar arasında ödem, enflamatuvar hücre infiltrasyonu ve damarsal yapılarda artış skorları kontrol grubu ile Kruskal Wallis metoduyla test edildi. Test sonucunda farkların istatistiksel olarak anlamlı bulunması üzerine gruplar yukarıdaki değişkenler bakımından ikili analizlerinde Bonferroni düzeltmesi yapılarak ( $p = 0.0063$ ) Mann-Whitney U testine tabii tutuldu. Ayrıca uzun dönem prezervatif madde uygulanan iki grup arasında Fisher's Exact Test kullanıldı.

## BULGULAR

Prezervatif madde uygulanan tüm gruplarda dikkati çeken ilk bulgu ödemdi. Ödem gelişimi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm gruplar için istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p= 0.0001$ ). Ancak prezervatif madde uygulanan tüm gruplar arasında ödem yönünden istatistiksel bir anlamlılık saptanmadı ( $p > 0.0063$ ).

Diğer önemli bulgu nazal mukozadaki enflamatuvar hücre infiltrasyonuydu. Prezervatif madde uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında farkın anlamlı olduğu saptandı ( $p < 0.05$ ). 1 hafta süreyle prezervatif madde kullanılan gruplar ve 4 hafta süreyle prezervatif kullanılan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı saptandı. Ancak 1 hafta ve 4 hafta benzalkonyum klorid uygulanan gruplar ve 1 hafta ve 4 hafta potasyum sorbat uygulanan gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık saptandı ( $p<0.0063$ ).

Yapılan ışık mikroskopik incelemede dikkat çeken bir bulgu da prezervatif uygulanan gruplarda nazal mukozada vasküler yapılarıdaki artışıdır. Prezervatif madde uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ).

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında; tıpkı enflamatuar hücre infiltrasyonunda olduğu gibi prezervatif maddelerin birbirinden 1 haftalık ve 4 haftalık kullanımları sonucunda nazal mukozada meydana getirdikleri damarsal yapılarıdaki değişikliklerin istatistiksel olarak farklı olmadığı ancak her iki prezervatifin de 4 hafta kullanımı ile 1 hafta kullanılmaları sonucu oluşan vasküler değişiklikler ve derecelerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ( $p<0.0063$ ).

İncelemelerde kaydedilen diğer önemli bulgu nazal mukozada skuamöz metaplazi ve intraepitelial gland gelişimiydi. İntraepitelial gland gelişimi skuamöz metaplazinin bir varyasyonu olarak kabul edilebilir. 1 hafta benzalkonyum klorid uygulanan grupta bir olguda izlenen intraepitelial gland gelişimi dışında skuamöz metaplazi ve intraepitelial gland gelişimi yalnızca 4 hafta prezervatif madde uygulanan gruplarda tespit edildi. Yapılan değerlendirmede kısa ve uzun dönem prezervatif uygulamaları arasında skuamöz metaplazi ve intraepitelial gland gelişimi açısından farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). 4 haftalık prezervatif uygulanan iki grup arasında ayrıca yapılan değerlendirmede benzalkonyum klorid ve potasyum sorbat kullanılan gruplar arasında bu parametreler bakımından farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ( $p>0.05$ ).

Transmisyon elektron mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nazal respiratuar epitelde hücre düzeyinde ultrastrüktürel olarak nükleus, granüllü endoplazmik retikulum gibi organellerde küçük farklılıklar izlense de bunlar örnekler arasındaki kabul edilebilir küçük farklılıklar olarak değerlendirildi. Gerek potasyum sorbat gerekse benzalkonyum kloridin 1 hafta boyunca uygulandığı gruplarda ultrastrüktürel olarak göze çarpan bir patolojiye rastlanmadı. Ancak özellikle benzalkonyum klorid uygulanan grupta daha fazla olmak üzere her iki prezervatifin de 4 hafta uygulandığı gruplarda benzer şekilde hücrelerde değişik boyutlarda çok sayıda sitoplazmik vakuol ve bazı hücrelerde silialı epitelin hemen altındaki yüzeyel sitoplazmik alanda mitokondrilerde şişme dikkat çekti.

Scanning elektron mikroskobu ile yapılan değerlendirmede 1 hafta süreyle benzalkonyum klorid uygulanan grupta burun mukozasında birkaç örnekte küçük alanlar halinde silia kaybı izlenmekle beraber genelde doku bütünlüğünün korunmuş olduğu gözlemlendi. Bu grupta göze çarpan en önemli bulgu silialardaki kümeleşme eğilimiydi. Bu kümeleşmeye



rağmen siliaların koordine bir şekilde aynı yöne eğilim gösterdikleri izlendi. 1 hafta potasyum sorbat uygulanan grupta ise örneklerde hiçbir alanda silia kaybı gözlenmedi. Bu grupta silialardaki kümeleşme eğiliminin daha belirgin olduğu dikkat çekti.

4 hafta boyunca benzalkonyum klorid uygulanan grupta silia kaybı izlenen alanlar daha sık karşımıza çıktı ve daha geniş olarak izlendi. Bu alanların ışık mikroskobu ile yapılan incelemede belirtilen skuamöz metaplazi gelişmiş alanlar olduğu düşünüldü. Nadiren de olsa bazı alanlarda goblet hücrelerinin burun boşluğuna bakan duvarlarının patlayarak canlılığını yitirdiği gözlemlendi. Doku geneline bakıldığında silialı epitelin mevcudiyetini sürdürdüğü ancak silialarda yoğun kümeleşmeler yer yer silialar arasında yapışıklıklar izlendi. Bu değişikliklere rağmen silialar yine koordine bir şekilde aynı yöne eğilim göstermekteydi.

4 hafta süreyle potasyum sorbat uygulanan grupta da benzer şekilde silia kaybı gösteren alanlar, silialarda yoğun kümeleşme ve yapışıklıklar izlendi. Yine silialar koordine bir şekilde aynı yöne eğilim gösteriyordu. Bu grupta denatüre goblet hücre grupları hiç karşımıza çıkmadı.

## SONUÇ

Gerek benzalkonyum klorid gerekse de potasyum sorbat solunum yolu epiteli için zararlı etkilere sahiptir. Burun içi solunum yolu epiteli in vivo ortamda bu maddelerin zararlı etkilerine karşı yukarıda saydığımız etmenlerden dolayı daha dirençlidir. Bizim araştırmamız 1 ve 4 haftalık uygulamalar sonrasında yaptığımız incelemelerde bütün direnç mekanizmalarına karşın patolojik değişmelerin geliştiğini ve uzamış uygulamalarda bu zararlı etkilerin daha da belirginleştiğini gösterdi.

## KAYNAKLARLAR

1. Cho JH , Kwun YS. Long term use of preservatives on rat nazal respiratory mucosa: Effects of benzalkonium chlorid and potassium sorbate. The Laryngoscope 2000. 110:312-17
2. Karcı B , Günhan Ö. Mukosilier Transport ve Sinüzitlerin Fizyopatolojisi. Endoskopik Sinüs Cerrahisi İzmir 1999. p.14-22
3. Lund VJ. Anatomy of the nose and paranasal sinusses. In: Scott-Brown's Otolaryngology, Sixth ed. Alan G. Kerr, (Ed.) Butterworth-Heinemann , Bath, 1997 p.1/5/1-29
4. Ballenger JB, Snow JB. The Clinical Anatomy and Physiology of nose and paranasal sinusses In: Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 15th Ed., Ballenger JB, Snow JB, Ed(s). 2000 Illinois p.3-18
5. Stevens A.,Lowe J. Ephetelial Cells In: Human Histology Second Edition. Stevens A.,Lowe J, Ed(s) Mosby London 1997 p.40-43
6. Stammberger H. Functional Endoscopic Sinus Surgery. Publisher: BC Decker. V:1 1990 p:17-39
7. Eugenia M. Vining. Rhinitis In: Textbook of Head and Neck Surgery Otolaryngology. Byran J. Bailey. JB Ed(s). Lippincott William Co. Philedelphia V.1 , 1998 269-87.
8. Lee AD Physiology of the nose and paranasal sinusses. In: In: Scott-Brown's Otolaryngology, Sixth ed. Alan G. Kerr, (Ed.) Butterworth-Heinemann , Bath, 1997 p.1/6/1-21
9. Lale AM, Mason JDT, Jones NS. Mucociliary transport and its assessment: a review. Clin. Otolaryngol 1998;23:388-96.
10. Ferguson JL, Mc Caffrey TV, Kern EB. The effects of sinus bacterio on human ciliated nasal ephetelium in vitro. Otolaryngology-Head and Neck Surgery 1997 116 (6;2): 1-9
11. Rodeheaver GT; Kurtz L; Kircher BJ; Edlich RF. Pluronic F-68: a promising new skin wound cleanser. Ann Emerg Med 1980 Nov;9(11):572-6
12. Harvey SC. Antiseptics and disinfectants; fungicides; ectoparasiticides. In: The pharmacological basis of thier apeutics. Goodman LS, Gilman A, Ed(s). New York: McGraw-Hill; 1985. p 971-2.
13. Kayaalp SO. Antiseptikler ve Dezenfektanlar. Tıbbi Farmakoloji Güneş Kitabevi 1994 Sayfa: 989-1006

14. Weiner M, Bernstein IL. Adverse reactions to drug formulation agents. New York: Marcel Dekker; 1989. p 178-81, 292-93.
15. Miszkiel KA, Beasley R, Rafferty P, Holgate ST. The contribution of histamine release to bronchoconstriction provoked by inhaled benzalkonium chloride in asthma. *Br J Clin Pharmacol* 1988 Feb;25(2):157-63.
16. Bernstein JA, Stauder T, Bemstein DI, Berntein IL. A combined respiratory and cutaneous hypersensitivity syndrome induced by work exposure to quaternary amines. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:257-9.
17. Klein GF, Sepp N, Fritsch P Allergic reactions to benzalkonium chloride: do the use test. *Contact Derm* 1991;25:269-70.
18. Sofos JN , Busta FF. Sorbic Acid and Sorbates. In: Antimicrobials in Food. Davidson PM.,Branen AL. Ed(s). . Second Edition Marcel Dekker,Inc. P.49-95
19. Bernstein IL. Is the use of benzalkonium chlorid as a preservative for nasal formulations a safety concern? A cautionary note based on compromised mucociliary transport. *J Allergy Clin Immunol Jan 2000 Rostrum*: 39-44
20. Köktürk İ. Elektron mikroskobu ve Araştırma Metotları. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları No:66 Bornova 1967.
21. Braat JPM, Ainge G, Bowles JAK, Richards DH, van Riessen D, Visser WT, et al. The lack of effect of benzalkonium chloride on the cilia of the nasal mucosa in patients with perennial allergic rhinitis: a combined functional, light, scanning and transmission electron microscopy study. *Clin Exp Allergy* 1995;25:957-65.
22. Kliment V. Similarity and dimensional analysis, evaluation of aerosol deposition in the lungs of laboratory animals and man. *Folia Morphol (Praha)* 1973;21(1):59-64
23. Van de Donk HJM, Zuidema J, Merkus FWHM. The effect of nasal drops on the ciliary beat frequency of chicken embryo tracheas. *Rhinology* 1981;19:215-30.
24. Van de Donk HJM, van den Heuvel AGM, Zuidema J, Merkus FWHM. The effects of nasal drops and their additives on human nasal mucociliary clearance. *Rhinology* 1982;20:127-37.
25. Van de Donk HJM, Muller-Plantema IP, Zuidema J, Merkus FWHM. The effects of preservatives on the ciliary beat frequency of chicken embryo tracheas. *Rhinology* 1980; 18:119-33.
26. Joki S, Saano V, Nuutinen J, Virta P, Karttunen P, Silvasti M, et al. Effects of some preservative agents on rat and guinea pig tracheal and human nasal ciliary beat frequency. *Am J Rhinology* 1996;10:181-6.

27. Stanley PJ, Griffin WM, Wilson R, Greenstone MA, Mackay IS, Cole PJ. Effect of betamethasone and betamethasone with neomycin nasal drops on human nasal mucociliary clearance and ciliary beat frequency. *Thorax* 1985;4(1):607-12.
28. Hofmann T, Wolf G, Koidl B. Action of topical corticosteroids and topical antihistamines on the ciliated epithelium of human nasal mucosa in vitro. *HNO* 1998;46:1-6.
29. McMahon C, Darby Y, Ryan R, Scadding G. Immediate and short-term effects of benzalkonium chloride on the human nasal mucosa in vivo. *Clin Otolaryngol* 1997; 22:318-22.
30. Graf P, Hallen H, Juto J-E. Benzalkonium chloride in a decongestant nasal spray aggravates rhinitis medicamentosa in healthy volunteers. *Clin Exp Allergy* 1995;25: 395-400.
31. Graf P, Hallen H. Effect on the nasal mucosa of long-term treatment with oxymetazoline, benzalkonium chloride, and placebo nasal sprays. *Laryngoscope* 1996;106:605-9.
32. Kuboyama Y, Suzuki K, Hara T. Nasal lesions induced by intranasal administration of benzalkonium chloride in rats. *J Toxicol Sci* 1997;22:153-60.
33. Berg OH, Lie K, Steinsvag SK. The effects of topical nasal steroids on rat respiratory mucosa in vivo, with special reference to benzalkonium chloride. *Allergy* 1997;52:627-32.
34. Ainge G, Bowles JAK, McCormick SG, Richards DH, Scales MDC. Lack of deleterious effects of corticosteroid sprays containing benzalkonium chloride on nasal ciliated epithelium: in vivo results in laboratory animals. *Drug Invest* 1994;8:127-33.
35. Steinsvag SK, Bjerknes R, Berg OH. Effects of topical nasal steroids on human respiratory mucosa and human granulocytes in vitro. *Acta Otolaryngol* 1996;116:868-75.
36. Berg OH, Henriksen RN, Steinsvag SK. The effect of a benzalkonium chloride-containing nasal spray on human respiratory mucosa in vitro as a function of concentration and time of action. *Pharmacol Toxicol* 1995;76:245-9.
37. Batts AH, Marriott C, Martin GP, Bond SW. The effect of some preservatives used in nasal preparations on mucociliary clearance. *J Pharm Pharmacol* 1989;41: 56-9.
38. Braga PC; Piatti G; Dal Sasso M; Bernini A. The effects of calcitonin nasal preparations and their excipients on mucociliary clearance in an ex-vivo frog palate test. *J Pharm Pharmacol* 1992 Nov;44(11):938-40



39. Liote H, Zahm JM, Pierrot D, Puchelle E. Role of mucus and cilia in nasal mucociliary clearance in healthy subjects. *Am Rev Respir Dis.* 1989 Jul;140(1):132-6.
40. Mygind N, Brofeldt S, Ostberg B, Cerkez V, Tos M, Marriott C. Upper respiratory tract secretions: pathophysiology. *Eur J Respir Dis Suppl* 1987;153:26-33. Review.

