

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
CERRAHİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ
KULAK BURUN BOĞAZ
ANABİLİM DALI

**RAT TİMPANİK MEMBRANINDA DENEYSEL
OLARAK OLUŞTURULAN MİRİNGOSKLEROZ
GELİŞİM SÜRECİNE N-NİTRO L-ARJİNİN
METİL ESTER'İN ETKİSİ**

DR. ERSOY DOĞAN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR – 2008

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
CERRAHİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ
KULAK BURUN BOĞAZ
ANABİLİM DALI

**RAT TİMPANİK MEMBRANINDA DENEYSEL
OLARAK OLUŞTURULAN MİRİNGOSKLEROZ
GELİŞİM SÜRECİNE N-NİTRO L-ARJİNİN
METİL ESTER'İN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ERSOY DOĞAN

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. TANER KEMAL ERDAĞ

İZMİR – 2008

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1 Timpanik membranın yapısı.....	7
4.1.1. Anatomik yapı.....	7
4.1.2. Histolojik yapı.....	9
4.2 Timpanik membranda yara iyileşmesi ve miringoskleroz oluşumu.....	10
4.3 Nitrik oksit ve peroksinitrit.....	12
4.4 N-Nitro L-Arjinin Metil Ester (L-NAME).....	14
5. GEREÇ VE YÖNTEM	15
5.1 Miringotomi.....	15
5.2 Çalışma grupları.....	16
5.3 Histopatolojik inceleme.....	18
5.4 İstatistiksel analiz.....	22
6. BULGULAR	23
6.1 Otomikroskopik miringoskleroz değerlendirmesi.....	23
6.2 Histopatolojik değerlendirme.....	26
6.2.1 Lamina propria da inflamasyon	27
6.2.2 Timpanik membranın kalınlığı.....	29
6.2.3 Miringoskleroz	30
7. TARTIŞMA	32
8. SONUÇ	40
9. KAYNAKLAR	41

TABLO LİSTESİ

TABLO 1	23
Otomikroskopik değerlendirmeye göre miringoskleroz bulguları	
TABLO 2	23
Gruplandırılmış otomikroskopik miringoskleroz bulguları	
TABLO 3	26
Çalışmadaki tüm histopatolojik verilerin dökümü	
TABLO 4	27
Lamina propriadaki inflamasyon şiddetinin gruplardaki dağılımı	
TABLO 5	29
Gruplardaki total timpanik membran kalınlığı ortalamaları	
TABLO 6	30
Histopatolojik incelemeye göre miringoskleroz bulguları	
TABLO 7	30
Gruplandırılmış histopatolojik miringoskleroz bulguları	

ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL 1	8
Rat ve insan timpanik membranlarının Şematik karşılaştırılması	
ŞEKİL 2	17
Otomikroskopik miringoskleroz değerlendirme Şeması	

RESİM LİSTESİ

RESİM 1	8
Sağ rat timpanik membranının medial yüzden görünümü	
RESİM 2	15
Otomikroskopik bakı altında yapılan miringotomi	
RESİM 3	18
Histopatolojik inceleme için hazırlanan timpanik membran	
RESİM 4	20
M grubundan örnek kesit	
RESİM 5	20
M+SF grubundan örnek kesit	
RESİM 6	21
M + tpk L-NAME grubundan örnek kesit	
RESİM 7	21
M + İP L-NAME grubundan örnek kesit	
RESİM 8	25
M grubuna ait bir timpanik membran	
RESİM 9	25
M+SF grubuna ait bir timpanik membran	
RESİM 10	25
M+İP L-NAME grubuna ait bir timpanik membran	
RESİM 11	25
M + tpk L-NAME grubuna ait bir timpanik membran	

KISALTMALAR

SOR	Serbest oksijen radikalleri
L-NAME	N-Nitro L-Arjinin Metil Ester
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
NO	Nitrik oksit
PT	Pars tensa
PF	Pars flaksida
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentetaz
nNOS	Nöral nitrik oksit sentetaz
M	Miringotomi
SF	Serum fizyolojik
İP	İntraperitoneal
tpk	Topikal

1. ÖZET

RAT TİMPANİK MEMBRANINDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN MİRİNGOSKLEROZ GELİŞİM SÜRECİNE N-NİTRO L-ARJİNİN METİL ESTER'İN ETKİSİ

Dr. Ersoy DOĞAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı

İnciraltı, İZMİR

Miringoskleroz, timpanik membranın lamina propriasındaki kollajen yapının hiyalin dejenerasyonu ve kalsifikasyonu ile karakterize bir patoloji olup, efüzyonlu otitis medianın tedavisinde miringotomi yapılması ya da ventilasyon tüpü uygulaması sonrasında ortaya çıkabilir. Miringotomi yapılarak timpanik membran hasarı oluşturulan deneysel çalışmalarda perforasyon iyileşmesi ve miringoskleroz gelişimi tüm yönleriyle ortaya konmuştur. Miringotomi sonrası orta kulaktaki oksijen konsantrasyonunun dış ortamdaki seviyesine ulaşmasıyla gelişen hiperoksik durumun serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşumuna neden olduğu; oluşan SOR'un ise doku hasarına yol açtığı gösterilmiştir. Doku hasarı sonrası fibrozis ve kalsifikasyonla seyreden iyileşme süreci miringosklerozla sonuçlanmaktadır.

Miringoskleroz gelişim sürecinin iyi bilinmesi miringoskleroz gelişimine karşı etkili tedavi stratejileri geliştirilmesi açısından önemlidir. Bu alanda yapılan çalışmalarda miringoskleroz gelişimini önlemeye yönelik birçok antioksidan ve antiinflamatuvar madde denenmiştir.

N-Nitro L-Arjinin Metil Ester (L-NAME), yapılan çeşitli çalışmalarda antiinflamatuvar, antioksidan ve antifibrotik etkileri kanıtlanmış, geniş kullanım alanına sahip bir maddedir. Birçok farklı dokudaki yara iyileşmesinde olumlu etkileri gösterilmiş olan L-NAME'nin kulak zarı perforasyonu iyileşmesi üzerine olan etkilerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada topikal ve intraperitoneal olarak uygulanan L-NAME'nin, timpanik membran iyileşmesi ve miringoskleroz gelişimi üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda 20 adet Wistar rat kullanılmıştır. Yapılan otomikroskopik bakıda sağlıklı timpanik membrana sahip olduğu görülen 20 rata bilateral miringotomi yapıldıktan sonra, hayvanlar her grupta beş rat olacak şekilde rastgele dört gruba ayrılmışlardır.

Birinci gruptaki beş rat tedavisiz bırakılmıştır. İkinci grupta ise 10 mikrolitre serum fizyolojik emdirilmiş gelfoam, miringotomiden hemen sonra, miringotomi sonrası 12. saatte ve 24. saatte olmak üzere üç kez her iki timpanik membrandaki perforasyon üzerine yerleştirilmiştir.

Üçüncü grupta, 10 mikrolitre (100 mg/ml) L-NAME emdirilmiş gelfoam miringotomiden hemen sonra, miringotomi sonrası 12. saatte ve 24. saatte her iki timpanik membrandaki perforasyon üzerine yerleştirilerek uygulanmıştır. Dördüncü grupta bulunan beş rata ise 10 mg/kg (5 mg/ml) dozundaki L-NAME miringotomiden hemen sonra, miringotomi sonrası 12. saatte ve 24. saatte intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

Ondört günlük iyileşme periyodu sonrasında yapılan otomikroskopik miringoskleroz değerlendirmesinin ardından, hayvanlar sakrifiye edilerek histopatolojik inceleme amacıyla timpanik membranları çıkarılmıştır. Yapılan histopatolojik değerlendirmede, Hematoksilen-Eozin ve Von Gieson ile boyanan kesitler ışık mikroskopu altında incelenerek inflamasyon skorlaması, timpanik membran kalınlığı ölçümü ve miringoskleroz skorlaması yapılmıştır.

Çalışma sonunda hem topikal hem de intraperitoneal olarak uygulanan L-NAME'nin, tedavisiz bırakılan ve topikal serum fizyolojik uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında, inflamasyonu baskıladığı, fibroblastik proliferasyonu azalttığı ve miringoskleroz gelişimini önlediği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: N-Nitro L-Arjinin Metil Ester, Miringoskleroz, Nitrik oksit, Timpanik membran, Miringotomi

2. SUMMARY

THE EFFECT OF N-NITRO L-ARGININE METHYL ESTER ON THE DEVELOPMENT PROCESS OF EXPERIMENTALLY INDUCED MYRINGOSCLEROSIS IN RAT TYMPANIC MEMBRANE

Ersoy Doğan, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, Dokuz Eylul University Medical School
Izmir, Turkey

Myringosclerosis is a pathology characterized with hyalin degeneration of collagenous structure and calcification in the lamina propria of tympanic membrane that may occur after myringotomy or ventilation tube insertion for the treatment of otitis media with effusion. Healing of the perforation and development of myringosclerosis were completely explained in the experimental studies in which tympanic membrane damage was created with myringotomy. Recently it has been shown that the hyperoxic condition developing after a myringotomy because of the increased O₂ concentration in the middle ear to the environmental level caused production of oxygen derived free radicals inducing tissue damage. Myringosclerosis is the result of healing process with fibrosis and calcification seen after tissue damage.

Clarification of the development of myringosclerosis is important to improve effective treatment regimens against myringosclerosis formation. A lot of antioxidants and antiinflammatory drugs have been tested in an effort to prevent myringosclerosis in the previous studies.

N-Nitro L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) is a widely-used substance which has proven antiinflammatory, antioxidant and antifibrotic effects, shown in different studies. Although the positive effects of L-NAME were shown in wound healing process of different tissues, there has been no study examining the effects of L-NAME in the healing of tympanic membrane perforation. In this study, the effects of L-NAME which had been used topically and intraperitoneally were investigated for tympanic membrane healing and development of myringosclerosis.

Twenty Wistar rats were used in our study. Rats with healthy tympanic membranes proven with otomicroscopic examination underwent bilateral myringotomies and were divided randomly into four groups, each including five rats.

The first group received no treatment. In the second group, 10 microliter saline soaked gelfoams were applied on the perforation of both tympanic membranes three times: immediately after myringotomy, in the 12th hour and the 24th hour. In the third group, 10 microliter (100 mg/ml) L-NAME soaked gelfoams were applied on the perforation of both tympanic membranes three times: immediately after myringotomy, in the 12th hour and 24th hour. In the fourth group, 10 mg/kg (5 mg/ml) L-NAME was injected intraperitoneally three times: immediately after myringotomy, in the 12th hour and 24th hour.

After a fourteen-day healing period, rats were sacrificed following otomicroscopic evaluation for myringosclerosis and tympanic membranes were removed for histopathologic examination. Sections stained with Hematoxylin-Eosin and Von Gieson were examined under light microscopy. While inflammation and myringosclerosis were scored, the thickness of tympanic membranes was also measured.

The present study showed that both topical and intraperitoneal applications of L-NAME suppressed inflammation, reduced fibroblastic proliferation and prevented formation of myringosclerosis in contrast to untreated and only saline applied group.

Key words: N-Nitro L-Arginine Methyl Ester, Myringosclerosis, Nitric oxide, Tympanic membrane, Myringotomy

3. GİRİŞ VE AMAC

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

Miringoskleroz etiyopatogenezini açıklamak amacıyla çeşitli hipotezler öne sürülmüş olmakla birlikte son yıllarda üzerinde en çok durulan faktör timpanik membranın kollajen tabakasında meydana gelen aşırı inflamatuvar reaksiyon ve doku hasarıdır (4,7,8). Sağlıklı insanlarda ve hayvanlarda orta kulaktaki O₂ konsantrasyonu % 5-10 arasındadır. Efüzyonlu otitis media tedavisi sırasında miringotomi yapılması ya da ventilasyon tüpü uygulaması sonucunda orta kulakta O₂ konsantrasyonu artmakta ve dış ortamdaki O₂ düzeyine ulaşmaktadır. Yapılan çalışmalarda orta kulaktaki hiperoksik ortamın SOR'un oluşumuna neden olduğu, bu durumun inflamatuvar süreci hızlandırarak doku hasarına yol açtığı gösterilmiştir (2,4,8-12). Bu nedenle, SOR'un salınımının engellenmesi ve doku hasarını oluşturan inflamasyonun azaltılması miringoskleroz gelişimini önlemede asıl hedef haline gelmiştir.

SOR, antioksidan özelliği olan bazı maddeler tarafından etkisiz hale getirilebilmektedir. Yapılan çeşitli deneysel çalışmalarda E vitamini, askorbik asit, selenyum, N-asetil sistein ve L-karnitin gibi antioksidan maddelerin kullanılması ile miringoskleroz oluşumunun önlenebileceği gösterilmiştir (3,4,7,9).

Peroksinitrit, travma ve inflamasyon sırasında dokuda üretimi artan toksik bir serbest radikaldir. Peroksinitrit, süperoksit ve nitrik oksit (NO) moleküllerinin reaksiyona girmesi sonucunda oluşmaktadır. NO'nun sitotoksik etkilerinden asıl sorumlu olan serbest radikal peroksinitrittir (13-15). NO akut inflamasyon sırasında indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) enzimi tarafından yüksek miktarlarda sentezlenmektedir. Deneysel timpanoskleroz oluşturulan ratların timpanik membranlarında ve orta kulak mukozalarında yapılan immünohistokimyasal incelemelerde iNOS enzim ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (2).

iNOS, NO sentezi sırasında yarı esansiyel bir aminoasit olan L-arjinini substrat olarak kullanmaktadır. iNOS enzimi için uygun substratı azaltan L-arjinin analogları kullanarak NO'nun aşırı üretimi azaltılabilir. Çalışmamızda bir L-arjinin analogu olan N-Nitro L-Arjinin Metil Ester (N_{ω} -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, N-5751 Sigma[®],Germany) kullanılmıştır.

L-NAME otoloji alanında yapılan deneysel çalışmalarda efüzyonlu otitis mediayı önleme ve çeşitli ajanların ototoksik etkilerinden korunma amacıyla kullanılmıştır (15-19). Bunun dışında akut inflamasyon ve yara iyileşme modellerinde L-NAME kullanılarak NO sentezinin inhibe edilmesinin inflamasyonu, doku hasarını ve kollajen depolanmasını azalttığı gösterilmiştir (20-24). Fakat birçok dokudaki yara iyileşmesinde olumlu etkileri gösterilmiş olan L-NAME'nin timpanik membran perforasyonu iyileşmesi ve miringoskleroz gelişimi üzerine olan etkilerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

Yara iyileşme modellerinde yapılan analizlerde yara oluşumu sonrası iNOS aracılığıyla gerçekleşen NO sentezinin ilk 24 saatte maksimum seviyeye ulaştığı ve maksimum iNOS inhibisyonunun ilk 24 saatte sağlanabildiği gösterilmiştir (21,22). Çalışmamızda L-NAME, akut inflamasyon fazındaki yüksek NO üretimini önlemeye yönelik olarak miringotomiden hemen sonra, miringotomi sonrası 12. saatte ve 24. saatte olmak üzere üç kez uygulanmıştır. Bu şekilde, miringotomi sonrası iNOS enzimi aracılığıyla gerçekleşen aşırı inflamasyon ve doku hasarının azaltılarak miringoskleroz gelişiminin önlenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Timpanik Membranın Yapısı

4.1.1 Anatomik Yapı

Orta kulağın lateral duvarının büyük bir kısmını oluşturan timpanik membran dış kulak yolu ile orta kulağı birbirinden ayırır. Erişkin bir insanda timpanik membranın ortalama kalınlığı 0.1 mm, vertikal çapı 10-11 mm, horizontal çapı ise 8-9 mm civarındadır (25). Hafifçe konkav olan dış yüzünün merkezi umbo olarak adlandırılır. Umbo, malleus uzun kolunun timpanik membrana tutunma yerini işaret eder.

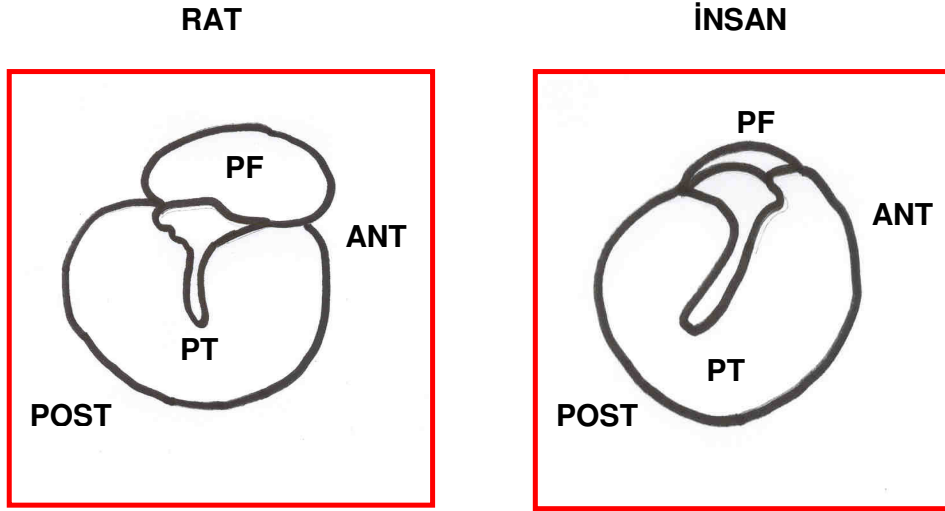
Timpanik membran, timpanomeatal halka da denilen sulkus timpanikus içerisine oturur. Timpanomeatal halkanın açık olan üst kısmına Rivinus çentiği denilir. Bu alanı skuamöz kemiğin skutum adı verilen parçası doldurur. Timpanik membran sulkus timpanikusa fibrokartilajinöz bir halka olan anulus fibrosus ile tespit edilmiştir. Bu fibrokartilajinöz halka Rivinus çentiğinin olduğu yerde bulunmamaktadır.

Malleusun lateral prosesinden anulusa doğru uzanan anterior ve posterior malleal plikalar timpanik membranı pars tensa (PT) ve pars flaksida (PF) olmak üzere iki ayrı parçaya ayırır. Alt parçayı oluşturan PT zarın gergin ve asıl titreşen kısmıdır. PT'nin orta kısmında manubrium mallei bulunur. Manubrium eksenine tam umbo noktasından çizilen dik çizgi PT'yi dört sanal parçaya ayırır. Bunlar ön-üst, ön-alt, arka-üst ve arka-alt parçalardır. Rivinus çentiğini dolduran üst parçaya ise PF ya da Shrapnell membranı denilir. PF, PT'ye göre daha gevşek bir yapıya sahiptir.

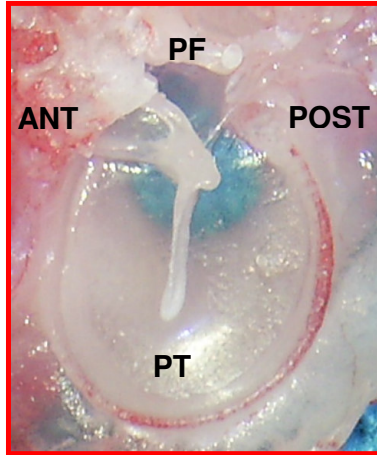
Rat ve insan timpanik membranları benzer anatomik özelliklere sahip olmakla birlikte birtakım farklılıklar göstermektedirler (26):

1. Ratlardaki PF insanlara oranla daha geniş bir alana sahiptir. Ratlarda PF, PT'nin yaklaşık üçte biri kadarken insanda ise yirmide biri kadardır.
2. Rat timpanik membranında malleusun kısa prosesi posterioru göstermekte iken insanda anterioru işaret eder.
3. Ratlarda manubrium mallei yukarıdan aşağıya kavislenerek uzanır. İnsanlarda ise manubrium mallei yukarıdan aşağıya uzanırken önden arkaya doğru yönelmektedir.

4. Rat timpanik membranının antero-posterior çapı 2.2-2.4 mm iken, insanınki 9-10 mm civarındadır.



Şekil 1. Rat ve insan timpanik membranlarının şematik karşılaştırılması (PF: Pars flaksida, PT: Pars tensa, ANT: Anterior, POST: Posterior)



Resim 1. Sağ rat timpanik membranının medial yüzden görünümü (PF: Pars flaksida, PT: Pars tensa, ANT: anterior, POST: posterior)

4.1.2 Histolojik Yapı

Timpanik membran histolojik olarak dışta epitel, ortada fibröz ve ite mukoza tabakasından oluşan üç katlı bir yapıdır. En dışta bulunan epitel tabakasını, dış kulak yolu cildi ile devamlılık gösteren çok katlı yassı epitel hücreleri oluşturmaktadır. En içte bulunan epitel tabakasını ise orta kulak mukozası ile devamlılık gösteren tek katlı epitel hücreleri oluşturmaktadır. İki epitel tabakası arasında yerleşmiş olan fibröz tabakaya lamina propria da denilmektedir. Lamina propria timpanik membranın PT ve PF kısımlarında histolojik farklılıklar göstermektedir. PT'de bulunan orta fibröz tabaka dışta radial ve ite sirküler seyirli kollajen liflerden oluşmaktadır. Radial ve sirküler lifler orta fibröz tabakayı subepitelyal ve submukoza katlarına ayırır. Bu katlarda fibroblastlar, endotelyal hücreler ve sinirler bulunmaktadır.

PF'nin orta fibröz tabakasını ise herhangi bir düzenlemeden yoksun, gevşek bir şekilde yerleşmiş olan kollajen ve elastin lifler oluşturmaktadır. PF'nin lamina propriası PT'den daha kalın ve daha az organize olmasıyla ayrılır. PT lamina propriası PF'ye oranla daha ince olmasına rağmen daha sert, elastik ve dayanıklı bir yapıya sahiptir (25,27).

Yapılan çalışmalarda rat ve insan timpanik membranlarının benzer histolojik yapıya sahip oldukları gösterilmiştir (27,28). Lamina propriayı oluşturan radial ve sirküler liflerin dizilim paternindeki benzerlik dikkat çekmektedir. Bu nedenle timpanik membran üzerine yapılan deneysel çalışmalarda sıklıkla rat tercih edilmektedir.

4.2. Timpanik Membranda Yara İyileşmesi ve Miringoskleroz Oluşumu

Çeşitli nedenlerle meydana gelen akut timpanik membran perforasyonlarının büyük bir kısmı kendiliğinden iyileşir. Timpanik membranda görülen bu güçlü kendi kendine iyileşme yeteneği, sahip olduğu epitelyal yapının proliferasyon ve migrasyon aktivitesine bağlanmaktadır (29).

Yapılan çeşitli çalışmalarda akut travmatik timpanik membran perforasyonu sonrası oluşan spontan tamir aşamaları ayrıntılarıyla ortaya konmuştur (30-33). Perforasyon kapanmasındaki en önemli rol, dıştaki epitel tabakanın sahip olduğu proliferasyon ve migrasyon yeteneğine aittir. Perforasyondan sonraki ilk iki gün içerisinde, rezidüel timpanik membranın dıştaki epitel katında yoğun bir proliferasyon başlamaktadır.

Wang ve ark. (34) rat timpanik membranındaki perforasyon iyileşme sürecinin, anulus ve manubrium mallei yakınındaki epitelde görülen mitotik aktivite ve proliferasyonla başladığını göstermişlerdir. Erken dönemdeki epitelyal proliferasyonun perforasyon kenarlarında değil de perforasyon alanından uzak olan anulus ve manubrium mallei civarında başlaması, Wang ve ark.'nın (34) çalışmalarında ortaya koydukları önemli bir noktadır. Periferde proliferasyon alan epitel hücreleri, perforasyon alanında biriken keratinin kılavuzluğunda perforasyon merkezine doğru ilerleyerek perforasyonu kapatırlar. Mukozal epitel tabakası ise perforasyon kapanma sürecinde minimal öneme sahiptir (29,31).

Yara iyileşme süreci inflamasyon, proliferasyon ve remodelasyon olarak adlandırılan iç içe geçmiş üç fazdan oluşmaktadır (35). Hasar oluşur oluşmaz trombositler yara bölgesine göç eder ve trombüs oluşur. Daha sonra oluşan vazokonstriksiyonla hemostaz sağlanır. Takiben inflamasyon fazı başlar. Hasar bölgesine migrasyon gösteren makrofajlar ve polimorfonükleer lökositlerden salınan sitokinler, vasküler geçirgenliğin artmasına ve ödem oluşumuna neden olurlar.

Timpanik membrandaki yara iyileşme sürecinde görülen hemostaz ve inflamasyon fazları diğer dokularla aynı olmasına rağmen, proliferasyon ve migrasyon fazları tamamen farklıdır. Diğer dokulardaki yara iyileşme sürecinde epitelizeasyondan daha önce granülasyon dokusu oluşur. Granülasyon dokusu, hasar sonucu oluşan defekti kapatarak üzerindeki epitelin ilerlemesi için yatak oluşturur.

Granülasyon dokusunun canlı bir epitel ile örtülmesinin ardından remodelasyon fazı başlar ve bu faz granülasyon dokusunun matür skar dokusuna dönüşümüyle sonuçlanır.

Timpanik membranda ise öncelikle proliferen olan epitel tarafından perforasyon kapatılır. Fibröz tabakanın oluşumu ise epitelizasyonu takiben ortaya çıkar. Oluşan fibröz tabakanın remodelasyonu sonucunda perforasyon alanında daha ince bir zar yapısı oluşur. Bunun yanında perforasyon alanından uzak olan sağlam alanlarda ise timpanik membran kalınlığının artmış olduğu görülmektedir (32,36). İnflamasyondan sonra oluşan fibroblastik aktivasyon ve kollajen sentezi, bu alanlarda timpanik membran kalınlığının artmasına neden olmaktadır.

Miringoskleroz, timpanik membrandaki yara iyileşme sürecinin farklı dönemlerinde ortaya çıkabilen geri dönüşümsüz bir durumdur. Yapılan çalışmalarda perforasyon sonrası dokuzuncu saatten itibaren miringosklerozun görülmeye başladığı bildirilmiştir (37). Perforasyon sonrası başlayan inflamatuvar sürecin dokuzuncu saat gibi erken döneminde gözlenen major histolojik bulgusu, kollajen tabakadaki yoğun makrofaj infiltrasyonudur. Bu nedenle artmış makrofaj infiltrasyonu ile miringoskleroz gelişimi arasında yakın ilişki olduğu düşünülmektedir. İnflamasyonun erken döneminde aktive olan makrofajlardan salınan NO ve diğer mediatörlerin neden olduğu doku hasarının iyileşmesi fibrozis ile sonuçlanmaktadır. Artmış fibroblastik aktivite ve kollajen sentezi hiyalinizasyona neden olmakta, hiyalinize alanların kalsifikasyonu sonucunda da miringoskleroz oluşmaktadır.

Santos ve ark. (38) miringoskleroz oluşumu ile sonuçlanan inflamatuvar süreci eksudasyon, granülasyon, fibrozis, hiyalinizasyon ve kalsifikasyon olmak üzere beş faza ayırarak incelemişler, hiyalinizasyon ve/veya kalsifikasyonun görüldüğünü miringoskleroz olarak nitelendirmişlerdir. Hücreden fakir bir zeminde birikmiş kollajen plakların oluşturduğu hiyalinizasyon ve hiyalinize kollajen matriks üzerinde oluşan kalsifikasyon bu sürecin geri dönüşümsüz fazlarıdır.

4.3. Nitrik Oksit ve Peroksinitrit

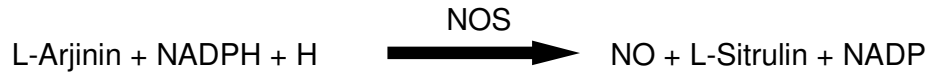
NO, vücuttaki hem fizyolojik hem de patofizyolojik süreçlerde rol oynayan önemli bir serbest radikaldir. Vasküler tonusun düzenlenmesi, kan basıncı ve böbrek fonksiyonlarının kontrol edilmesi, nöral iletinin sağlanması gibi fizyolojik olaylarda düzenleyici rolü vardır. Fizyolojik olaylarda mediatör görevi yapan NO, sürekli kontrol altında ve belirli konsantrasyonlarda üretilmektedir. İnflamasyon gibi patolojik süreçlerde ise kontrolsüz şekilde ve yüksek miktarlarda sentezlenebilir. Düşük konsantrasyonlarda ve oksijen yokluğunda stabil olan NO'nun yarılanma ömrü çok kısadır (6-20 saniye) ve hızla inaktif metabolitleri olan nitrat (NO_3^-) ve nitrit'e (NO_2^-) dönüştürülür (39). Yüksek konsantrasyondaki NO ise ortamda bulunan O_2 ve SOR ile reaksiyona girerek hücre hasarı oluşturuca etkiler gösterir.

NO sentezinden sorumlu olan NOS enzimi sinir hücresi, vasküler endotel, trombosit, nötrofil ve makrofaj gibi birçok farklı hücrede bulunmaktadır. NOS enziminin; nöral NOS (nNOS), endotelyal NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) olmak üzere farklı lokalizasyon ve düzenlemeye sahip üç izoenzimi vardır (40,41). Nöral iletide fonksiyon gören nNOS ile vasküler tonusun düzenlenmesinden sorumlu olan eNOS'a yapısal NOS (cNOS) da denilmektedir. iNOS ise normal fizyolojik şartlarda bulunmazken, inflamasyon ve enfeksiyon sırasında sitokinler ve endotoksinler tarafından indüklenerek yüksek miktarlarda üretilir. İnflamasyon sırasında ortaya çıkan iNOS, eNOS ve nNOS'tan yaklaşık 1000 kat daha fazla NO üretmektedir (16,41). Yapılan çalışmalarda IL-6 (İnterlökin-6), TNF- α (Tümör Nekroz Faktör-Alfa) ve IF- γ (İnterferon-gama) gibi proinflamatuvar sitokinlerin iNOS'u indükleyerek NO üretimini artırdıkları gösterilmiştir (12, 42,43).

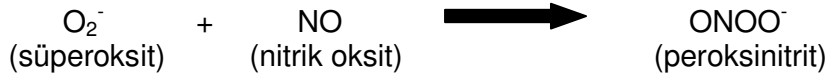
Bakteri inokülasyonu sonrası akut otitis media oluşturulan rat timpanik membranlarındaki inflamatuvar hücre ve mediatörlerin incelendiği bir çalışmada, iNOS ekspresyonunun inflamasyonun erken dönemlerinde maksimum seviyeye ulaştığı, geç dönemlerinde ise giderek azaldığı gösterilmiştir (44). Makrofaj infiltrasyonu ile iNOS ekspresyonunun aynı zaman aralığında maksimum düzeye çıkması, akut inflamasyon sırasındaki iNOS sentezinin başlıca makrofajlar tarafından yapıldığını düşündürmektedir. Bakteri endotoksinlerinin ve çeşitli sitokinlerin uyarısına sekonder olarak makrofaj aktivasyonu olmakta ve aktive olan makrofajlar

tarafından eksprese edilen iNOS vasıtasıyla yüksek miktarda NO üretimi yapılmaktadır. iNOS ekspresyonu için birkaç saate ihtiyaç vardır. Endotoksinle uyarılan makrofajlarda iki saat sonra iNOS mRNA, dört saat sonra iNOS proteini meydana gelmektedir.

iNOS yarı esansiyel bir aminoasit olan L-arjinin'i substrat olarak kullanmakta ve sonuçta NO ve L-sitrülin oluşmaktadır. NO'nun aşırı üretimini azaltmanın en uygun yolu, NOS enzimi için uygun substratı azaltan L-arjinin analogları kullanmaktır.



Yüksek miktarlarda üretilen NO, inflamasyon ve normalden yüksek parsiyel O₂ basıncı varlığında ortaya çıkan süperoksit radikali ile reaksiyona girerek peroksinitriti oluşturur.



NO'nun zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur. (14,43-46) Peroksinitritin toksik etki potansiyeli NO ve süperoksite oranla daha fazladır (47). Peroksinitrit patojenlere karşı gösterdiği sitotoksik etkiyle vücut savunmasında önemli bir fizyolojik rol üstlenir (42,47). Bunun yanında, yüksek miktarlarda ve kontrolsüz üretilmesi durumunda organizmanın kendi hücrelerinde de hasar oluşturabilir (14,43). Peroksinitritin hücre hasarı oluşturucu etkisi hücre membranlarındaki lipid peroksidasyonunu başlatmasıyla ortaya çıkar. Hücrelerin lipid, protein, enzim, DNA ve mitokondri gibi önemli yapılarına etki ederek hücre ölümlerine yol açar (43,47). Birçok kronik hastalığın ortaya çıkmasında NO ve peroksinitrit aracılığıyla gerçekleşen uzamış inflamatuvar cevabın rol oynadığı düşünülmektedir (48,49).

4.4 N-Nitro L-Arjinin Metil Ester (L-NAME)

L-arjinin analogu olan L-NAME, nonspesifik bir NOS inhibitörüdür. NOS enziminin üç formunu da inhibe etmekle birlikte, endotelial ve nöral NOS'a olan afinitesi iNOS'a olan afinitesinden daha yüksektir (40). L-NAME, NO sentezi için gerekli olan L-arjinin ile yarışmaya girerek NOS enzimi için uygun substratı azaltır ve NO sentezini engeller. Bu nedenle, artmış NO üretiminin sorumlu tutulduğu patolojik süreçlerin önlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan L-NAME'nin sinir hücresi, deri, akciğer ve kas tendonu gibi dokulardaki antioksidan, antiinflamatuvar ve antifibrotik etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir. Otoloji alanında yapılan çalışmalarda, artmış NO sentezinin suçlandığı efüzyonlu otitis media ve ototoksisite gibi patolojilerin önlenmesinde L-NAME'nin antiinflamatuvar ve antioksidan etkilerinden faydalanılmıştır (15-19). Çalışmamız miringotomi ile akut hasar oluşturulan rat timpanik membranında, L-NAME'nin antiinflamatuvar ve antifibrotik etkileriyle miringoskleroz oluşumunu azaltabileceği düşünülerek planlanmıştır.

Timpanik membranda yara iyileşmesi ve miringoskleroz gelişim sürecini incelediğimizde, NO'nun direkt rol aldığı üç önemli nokta dikkati çekmektedir. L-NAME'nin bu üç noktaya etki ederek miringoskleroz gelişimini azaltabileceğini düşünmekteyiz:

1. Makrofajlar tarafından üretilen NO'nun indüklediği inflamatuvar cevabın azaltılarak doku hasarının hafifletilmesi.
2. Doku hasarının iyileşmesi sırasında oluşan fibroblastik aktivitenin azaltılarak fibrozisin ve hiyalinizasyonun engellenmesi.
3. Hiyalinize kollajen matrikste oluşan kalsifikasyonun önlenmesi.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu onayı (05.10.07 tarih ve 94 sayılı yazı) alındıktan sonra DEÜTF Multidisipliner Laboratuvarında üretilmiş olan ve ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen Wistar ratlar çalışmaya alındı.

5.1 Miringotomi

Intraperitoneal 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketar® , Pfizer Warner Lambert, ABD) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (Ksilazol, Provet Veteriner Ürünleri Sanayi İstanbul, Türkiye) enjeksiyonuyla sağlanan anestezi sonrası yapılan otomikroskopik bakıda bilateral normal timpanik membrana sahip olduğu görülen 20 adet rat çalışmaya dahil edildi. Otomikroskopik görüş altında, kulak spekulumu ve steril pik (EM-2056, Ömür Cerrahi Aletler, Antalya, Türkiye) kullanılarak her iki timpanik membranın arka üst kadranına 1 mm çapında standart miringotomi yapılan ratlar her grupta beş hayvan olacak şekilde rastgele dört gruba ayrıldı (Resim 2).



Resim 2. Otomikroskopik bakı altında yapılan miringotomi

5.2. Çalışma Grupları

Bilateral timpanik membranlarının arka üst kadranına pik ile miringotomi yapılan 20 adet rat dört gruba ayrıldı.

Grup Miringotomi (M) (n=10) : Bu gruptaki beş ratın toplam 10 kulak zarına, tanımlanan standartlarda yapılan miringotomi sonrası herhangi bir tedavi uygulanmadı.

Grup Miringotomi + topikal serum fizyolojik (M+SF) (n=8^a) : Bu gruptaki beş ratın toplam 10 kulağına miringotomiden hemen sonra, miringotomi sonrası 12. saatte ve 24. saatte olmak üzere üç kez 10 mikrolitre serum fizyolojik emdirilmiş gelfoam (Stypro[®] Haemostypticum, Kleinostheim, Germany), perforasyon üzerine gelecek şekilde yerleştirildi.

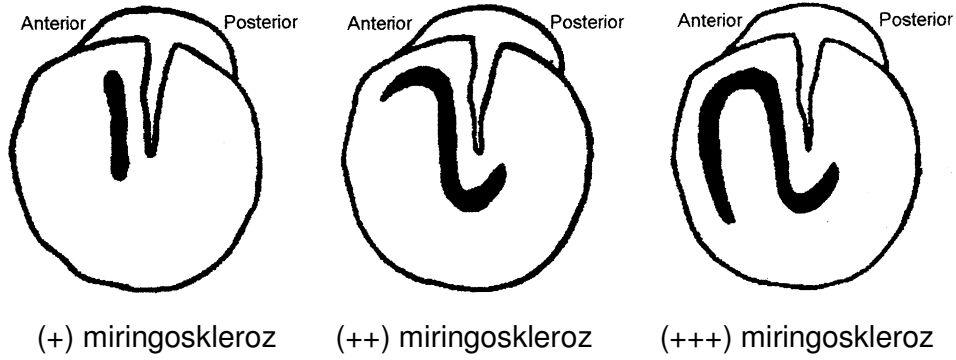
^a Ondördüncü günde yapılan otomikroskopik bakıda, bu gruba ait bir ratın her iki timpanik membranında enfeksiyon ile uyumlu görünüm izlendi. Mikroskopik diseksiyonla bullaların açılması sırasında her iki bulla içerisinde yoğun efüzyon olduğu görüldü. Hazırlanan bu iki spesmenin histopatolojik incelemesinde yoğun polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu ve fibrin birikimi görülmesi üzerine, enfekte oldukları kabul edilerek her iki timpanik membran da çalışma dışı bırakıldı.

Grup Miringotomi + topikal L-NAME (M+tpk L-NAME) (n=10) : Bu gruptaki beş ratın toplam 10 kulağına, miringotomiden hemen sonra, miringotomi sonrası 12. saatte ve 24. saatte olmak üzere üç kez 10 mikrolitre (100 mg/ml) L-NAME emdirilmiş gelfoam, perforasyon üzerine gelecek şekilde yerleştirildi.

Grup Miringotomi + intraperitoneal L-NAME (M+İP L-NAME) (n=10) : Bu gruptaki bilateral miringotomi yapılan beş rata miringotomiden hemen sonra, miringotomi sonrası 12. saatte ve 24. saatte olmak üzere üç kez 10 mg/kg (5 mg/ml) L-NAME intraperitoneal olarak verildi.

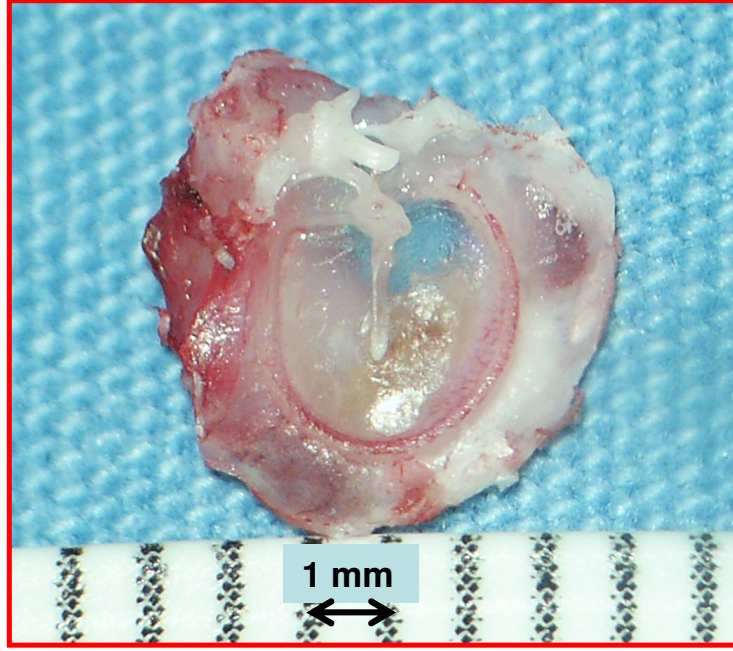
Miringotomi sonrasında hayvanlar 14 günlük iyileşme periyoduna bırakıldılar. Standart laboratuvar koşullarında pelet yemler ile beslenen hayvanlarda su ve beslenme serbest bırakıldı. L-NAME dışında herhangi bir kemoproflaksi uygulanmadı.

Çalışmanın 14. gününde otomikroskopik olarak miringoskleroz değerlendirilmesi yapıldı. Buna göre; otomikroskopik bakıda görünür sklerotik lezyon yoksa (0), yalnızca malleus koluna komşu yerleşimli sklerotik lezyon varsa (+), malleus koluna komşu sklerotik lezyonlarla birlikte ön üst kadranda da sklerotik lezyon varsa (++), malleus kolundan anulusa ulaşan ve anulus boyunca uzanan geniş sklerotik lezyonlar varsa (+++) olacak şekilde skorlandı (7).



Şekil 2. Otomikroskopik miringoskleroz değerlendirme şeması

Otomikroskopik değerlendirme yapıldıktan sonra hayvanlar yüksek doz intraperitoneal pentotal (Pental® Sodyum, İ. E. Ulagay İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye) (80 mg/kg) enjeksiyonunu takiben dekapite edildi. Dekapitasyon sonrası ratların bullaları çıkarıldı. Çıkarılmış olan bullalar açıldıktan sonra timpanik membranlar direkt görüş altına alındı. Mikroskopik görüş altında diseke edilen timpanik membranlar kendilerini çevreleyen kemik anulus ve 1-2 mm dış kulak yolu ile birlikte çıkarıldı (Resim 3).



Resim 3. Histopatolojik inceleme için hazırlanan timpanik membran

5.3 Histopatolojik İnceleme

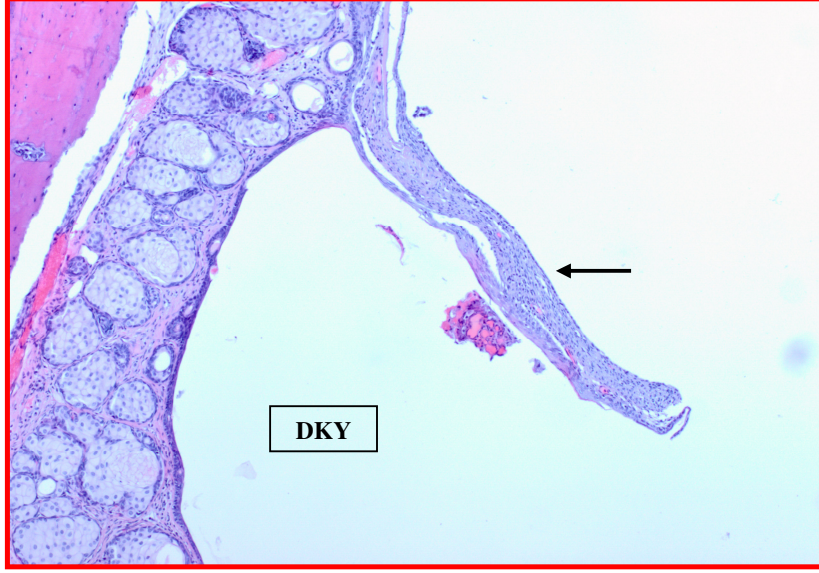
Çalışmanın histopatolojik hazırlık ve değerlendirme işlemleri DEÜTF Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Tüm histopatolojik değerlendirmeler, hangi çalışma grubuna hangi tedavinin uygulandığını bilmeyen, aynı patolog tarafından yapıldı.

Her iki kulaktan hazırlanan spesmenler %10'luk formaldehit solüsyonuna koyularak histopatolojik inceleme için ayrıldı. Formol fiksasyonu sonrası, dekalsifikasyon amacıyla dokuz saat formik asitte tutulan spesmenler mikroskopik görüş altında manubrium mallei'ye dik doğrultuda, miringotomi alanından geçecek şekilde ikiye ayrıldı. Her iki parça kesit yüzü üzerine yatırılarak parafin blokları hazırlandı. Alınan beş mikrometre kalınlığındaki kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Von Gieson (VG) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi (Resim 4-7). Timpanik membranın kollajen tabakasındaki sklerotik değişimlerin değerlendirilmesi VG boyalı kesitlerden alınan görüntüler ile yapıldı.

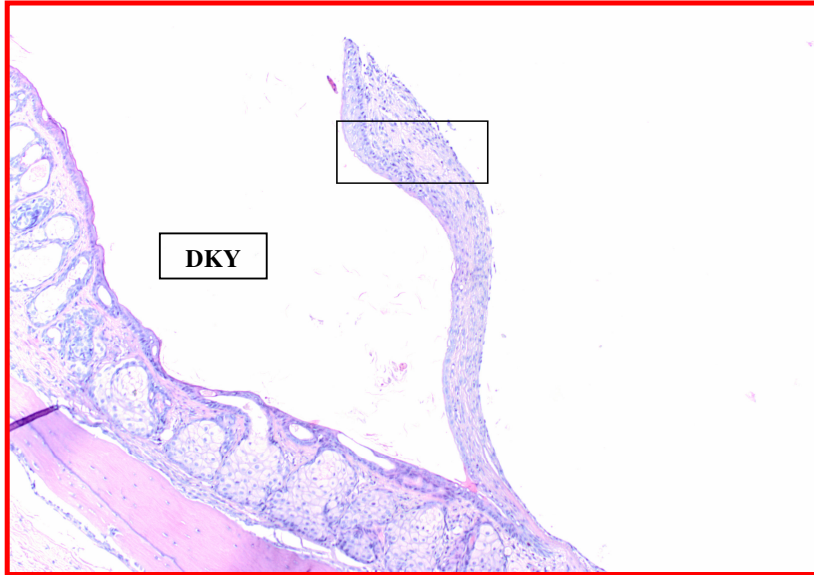
Timpanik membran lamina propriasında gözlenen inflamasyon 0-3 puan arasında bir değer verilerek semikantitatif olarak skorlandı. (İnflamasyon yok: 0, hafif inflamasyon: 1, orta derecede inflamasyon: 2, şiddetli inflamasyon: 3)

Timpanik membran total kalınlığının ölçümü için H&E boyalı kesitlerden elde edilen mikroskopik görüntüler bir kamera (Olympus BX50, Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) ile bilgisayara aktarıldı. Kullanılan büyötmeye göre kalibre edilerek, timpanik membran kalınlıkları mikrometre cinsinden 10 alanda ölçüldü ve bu ölçümlerin ortalamaları timpanik membran kalınlığı olarak kabul edildi.

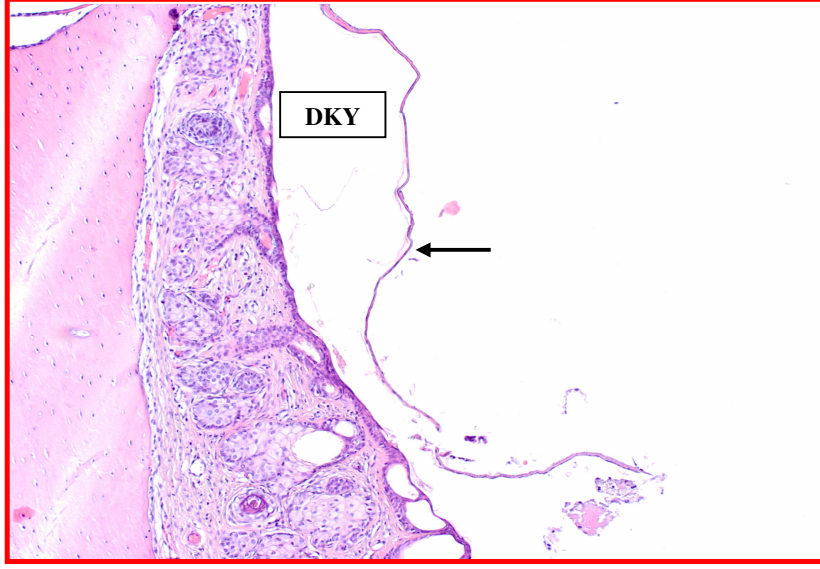
VG boyalı kesitlerden elde edilen görüntüler kullanılarak timpanik membran lamina propriasındaki sklerotik lezyonların değerlendirmesi yapıldı. Bulgular 0-2 puan arasında bir değer verilerek semikantitatif olarak skorlandı. (Miringoskleroz yok: 0, lamina propriada ayrı ayrı yerleşmiş seyrek sklerotik lezyon: 1, bir arada bulunan geniş sklerotik lezyon: 2)



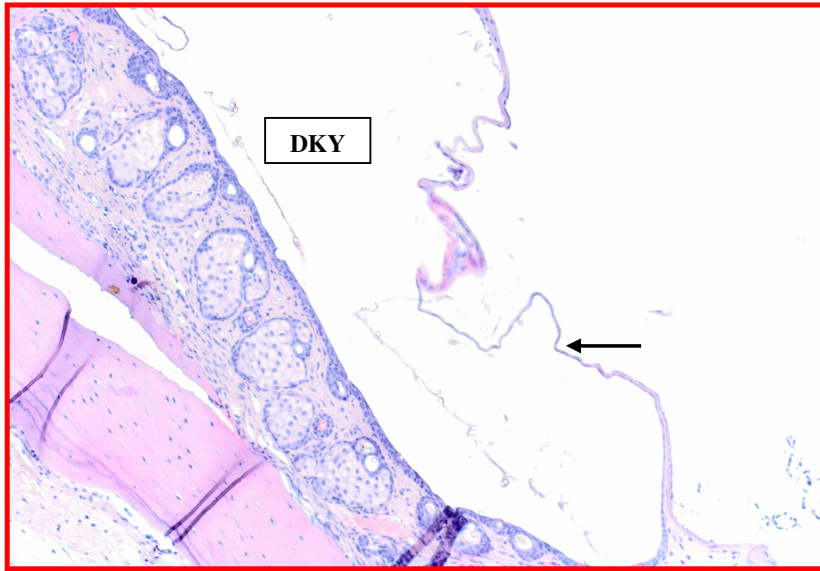
Resim 4. M grubundan örnek kesit. Ok ile işaretli timpanik membranda belirgin kalınlaşma izleniyor. Lamina propriada yoğun inflamasyon ve skleroz gelişimi mevcut (DKY: dış kulak yolu).



Resim 5. M+SF grubundan örnek kesit. Artmış timpanik membran kalınlığı dikkat çekiyor. İşaretli alanda, lamina propriadaki yoğun inflamasyon ve hiyalinizasyon gösterilmektedir (DKY: dış kulak yolu).



Resim 6. M+tpk L-NAME grubundan örnek kesit. Ok ile işaretlenen timpanik membranda fibroblastik proliferasyonun ve sklerotik değişimlerin olmadığı, timpanik membranın M ve M+SF gruplarına göre daha ince olduğu görölmektedir (DKY: dış kulak yolu).



Resim 7. M+İP L-NAME grubundan örnek kesit. M ve M+SF grubuna göre timpanik membran kalınlığının belirgin olarak daha az olduğu görölmektedir (DKY: dış kulak yolu).

5.4 İstatistiksel Analiz

Otomikroskopik miringoskleroz ve lamina propriada inflamasyon değerlendirme sonuçları, semikantitatif skorlamaya dayalı veriler olduğu için gruplar arasında istatistiksel bir karşılaştırma yapmak amacıyla sonuçlar yok-hafif (skoru 0 ve 1 olanlar) ve orta-ağır (skoru 2 ve 3 olanlar) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Histopatolojik miringoskleroz sonuçları ise yok-seyrek (skoru 0 ve 1 olanlar) ve geniş (skoru 2 olanlar) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Gruplar arasındaki farklılığı test etmek için Fischer's Exact Test kullanıldı.

Timpanik membran ortalama kalınlık değerleri ise ikili gruplar arasında Mann-Whitney U testi kullanılarak test edildi. Kullanılan tüm analizlerde $p \leq 0.05$ değeri istatistiksel anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1 Otomikroskopik Değerlendirme

Elde edilen bulgular Tablo 1’de sunulmuştur.

Tablo 1. Otomikroskopik değerlendirmeye göre miringoskleroz bulguları

Grup	Miringoskleroz				
	Sayı	MS yok (0)	Hafif MS (+)	Orta MS (++)	Şiddetli MS (+++)
M	10	0	2	4	4
M+SF	8	1	1	3	3
M+tpk L-NAME	10	6	2	2	0
M+İP L-NAME	10	5	2	2	1

(M: miringotomi, MS: miringoskleroz, SF: serum fizyolojik, tpk: topikal
İP: intraperitoneal, L-NAME: N-Nitro L-Arjinin Metil Ester)

Otomikroskopik miringoskleroz skorları değerlendirilirken gruplar arasında Fischer’s Exact Test ile istatistiksel analiz yapılabilmesi için sonuçlar yok-hafif (skoru 0 ve 1 olanlar) ve orta-ağır (skoru 2 ve 3 olanlar) olmak üzere iki gruba ayrıldı.

Tablo 2. Gruplandırılmış otomikroskopik miringoskleroz bulguları

GRUP	Otomikroskopik Miringoskleroz				Toplam	
	Yok / Hafif 0 / (+)		Orta / Şiddetli (++) / (+++)			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
M	2	20.0	8	80.0	10	100.0
M+SF	2	25.0	6	75.0	8	100.0
M+tpk L-NAME	8	80.0	2	20.0	10	100.0
M+İP L-NAME	7	70.0	3	30.0	10	100.0

(M: miringotomi, SF: serum fizyolojik, tpk: topikal, İP: intraperitoneal, L-NAME: N-Nitro L-Arjinin Metil Ester)

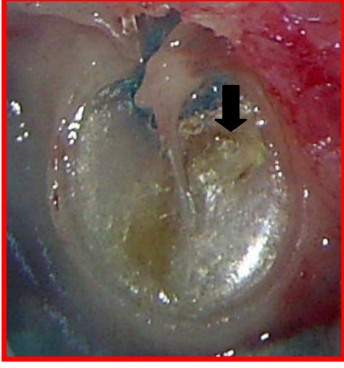
Miringotomi sonrası tedavi verilmeyen M grubundaki orta-şiddetli miringoskleroz oranı % 80 iken, miringotomi sonrası topikal serum fizyolojik uygulanan M+SF grubundaki orta-şiddetli miringoskleroz oranı % 75 olarak bulundu.

L-NAME ile tedavi edilen gruplara baktığımızda, topikal L-NAME uygulanan M+tpk L-NAME grubundaki orta-şiddetli miringoskleroz oranı % 20, intraperitoneal L-NAME uygulanan M+İP L-NAME grubundaki orta-şiddetli miringoskleroz oranı ise % 30 olarak bulundu.

Otomikroskopik miringoskleroz açısından istatistiksel değerlendirme yapıldığında, tedavi verilmeyen M grubu ile serum fizyolojik uygulanan M+SF grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=1.00$).

Otomikroskopik miringosklerozun, topikal L-NAME uygulanan M+tpk L-NAME grubunda tedavisiz bırakılan M grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi ($p=0.02$). M+tpk L-NAME grubu ile M+SF grubu karşılaştırıldığında ise istatistiksel anlamlılığa yakın olmakla birlikte p değerinin 0.05'in hemen üzerinde kaldığı görüldü ($p=0.054$) ve bu sonuç denek sayısının azlığına bağlandı.

M+tpk L-NAME ve M+İP L-NAME grupları arasında ise otomikroskopik miringoskleroz açısından anlamlı farklılık bulunmadı ($p=1.00$).



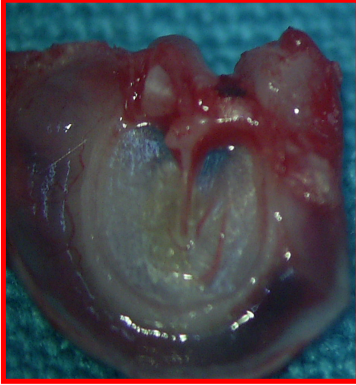
Resim 8. M grubuna ait bir timpanik membran.

Ok ile işaretli perforasyon alanının kalın bir zar yapısıyla kapandığı görülmektedir. Diğer alanlarda yaygın skleroz izlenmektedir.



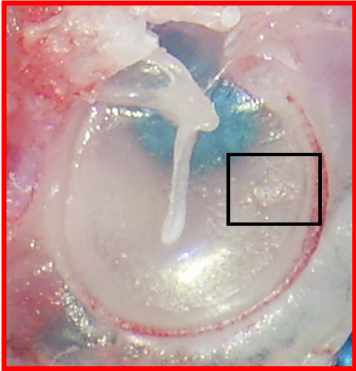
Resim 9. M+SF grubuna ait bir timpanik membran.

Artmış timpanik membran kalınlığı ile birlikte tüm kadrantlarda yaygın skleroz mevcut.



Resim 10. M+İP L-NAME grubuna ait bir timpanik membran.

Umbo çevresinde az miktarda sklerotik lezyon izlenmektedir. Diğer alanlarda sklerozun olmadığı, zarın şeffaf ve ince yapısını koruduğu gözlenmektedir.



Resim 11. M+tpk L-NAME grubuna ait bir timpanik membran.

İşaretli olan arka-üst kadrantdaki miringotomi alanının daha ince bir zar yapısıyla kapandığı görülmektedir. Diğer alanlarda ise sklerotik lezyon içermeyen şeffaf ve ince görünüm dikkat çekmektedir.

6.2 Histopatolojik Değerlendirme

Tablo 3. Çalışmadaki tüm histopatolojik verilerin dökümü

	Grup Miringotomi			Grup Miringotomi + Topikal SF			Grup Miringotomi + Topikal L-NAME			Grup Miringotomi + IP L-NAME		
	İS	TMK	MS	İS	TMK	MS	İS	TMK	MS	İS	TMK	MS
1	2	63	2	3	94	2	0	14	0	1	25	1
2	1	40	1	2	80	2	1	10	0	1	32	1
3	2	85	2	2	66	2	0	59	1	0	11	0
4	2	91	2	2	60	2	1	15	0	0	12	1
5	3	154	2	1	43	0	0	12	0	1	48	1
6	2	60	1	2	72	2	0	12	0	1	25	0
7	2	107	2	1	63	1	2	70	2	0	18	0
8	2	73	2	0	25	0	0	12	0	1	63	2
9	1	56	2				0	14	0	0	13	0
10	1	50	1				0	62	1	0	8	0

(İS: inflamasyon skoru, TMK: timpanik membran kalınlığı, MS: miringoskleroz skoru)

6.2.1 Lamina Propriada İnflamasyon

Elde edilen bulgular Tablo 4'te sunulmuştur. Lamina propria inflamasyon skorları değerlendirilirken gruplar arasında Fischer's Exact Test ile istatistiksel analiz yapılabilmesi için sonuçlar yok-hafif (skoru 0 ve 1 olanlar) ve orta-ağır (skoru 2 ve 3 olanlar) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

Miringotomi yapıldıktan sonra tedavisiz bırakılan M grubundaki üç olguda hafif, altı olguda orta ve bir olguda şiddetli inflamasyon tespit edilmiştir. Miringotomi sonrası topikal serum fizyolojik uygulanan M+SF grubundaki sekiz olgunun birinde inflamasyon izlenmezken ikisinde hafif, dördünde orta ve bir tanesinde şiddetli inflamasyon tespit edilmiştir.

L-NAME ile tedavi edilen gruplara baktığımızda, topikal L-NAME uygulanan M+tpk L-NAME grubundaki yedi olguda inflamasyon görülmezken iki olguda hafif, bir olguda ise orta inflamasyon saptanmıştır. İntraperitoneal L-NAME uygulanan M+İP L-NAME grubundaki olguların beşinde inflamasyon görülmezken geriye kalan beş tanesinde ise hafif inflamasyon tespit edilmiştir.

Tablo 4. Lamina propriadaki inflamasyon şiddetinin gruplardaki dağılımı

GRUP	Lamina propriada inflamasyon				Toplam	
	Yok / Hafif		Orta / Şiddetli		Sayı	%
	Sayı	%	Sayı	%		
M	3	30.0	7	70	10	100.0
M+SF	3	37.5	5	62.5	8	100.0
M+tpk L-NAME	9	90.0	1	10	10	100.0
M+İP L-NAME	10	100.0	0	0.0	10	100.0

(M: miringotomi, SF: serum fizyolojik, tpk: topikal, İP: intraperitoneal, L-NAME: N-Nitro L-Arjinin Metil Ester)

Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; topikal L-NAME uygulanan M+tpk L-NAME grubundaki inflamasyon şiddetinin hem M hem de M+SF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p=0.02$ ve $p=0.04$).

Intraperitoneal L-NAME uygulanan M+İP L-NAME grubunda da benzer sonuçlar alındı. İP L-NAME'nin inflamasyonu, tedavisiz bırakılan ve topikal SF uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı görüldü ($p=0.003$ ve $p=0.007$).

Topikal L-NAME uygulanan M+tpk L-NAME grubu ile intraperitoneal L-NAME uygulanan M+İP L-NAME grupları arasında ise inflamasyon şiddeti açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=1.00$).

6.2.2 Timpanik Membranın Kalınlığı (mikrometre)

Gruplardaki timpanik membran kalınlığı ölçümlerinin ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 5'te verilmiştir. Timpanik membran total kalınlığının ölçümü için H&E boyalı kesitlerden elde edilen mikroskopik görüntüler bir kamera (Olympus BX50, Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) ile bilgisayara aktarıldı. Kullanılan büyütmeye göre kalibre edilerek mikrometre cinsinden 10 alanda ölçüldü ve bu ölçümlerin ortalamaları timpanik membran kalınlığı olarak kabul edildi.

İkili gruplar arasındaki timpanik membran kalınlığı ortalamalarının farklılığını incelemek için Mann-Whitney U testi kullanıldı.

M grubu ile M+SF grubu arasında, hesaplanan timpanik membran kalınlığı ortalamaları karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.534$). M+tpk L-NAME grubunda ölçülen timpanik membran kalınlığının M grubu ve M+SF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az olduğu belirlendi ($p=0.004$ ve $p=0.008$).

M+İP L-NAME grubunda hesaplanan ortalama timpanik membran kalınlığı, hem M hem de M+SF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az bulundu ($p=0.001$ ve $p=0.004$).

M+tpk L-NAME ve M+İP L-NAME grupları arasında yapılan karşılaştırmada ise ortalama timpanik membran kalınlığı açısından anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.909$).

Tablo 5. Gruplardaki total timpanik membran kalınlığı ortalamaları

GRUP	Ortalama (mikrometre)	Standart sapma
M	77.9	33.5
M+SF	62.8	21.3
M+tpk L-NAME	28.0	24.7
M+İP L-NAME	25.5	17.8

(M: miringotomi, SF: serum fizyolojik, tpk: topikal, İP: intraperitoneal, L-NAME: N-Nitro L-Arjinin Metil Ester)

6.2.3 Miringoskleroz

Elde edilen bulgular Tablo 6'da sunulmuştur.

Tablo 6. Histopatolojik incelemeye göre miringoskleroz bulguları

Grup	Miringoskleroz			
	Sayı	MS yok (0)	Seyrek MS (+)	Geniş MS (++)
M	10	0	3	7
M+SF	8	2	1	5
M+tpk L-NAME	10	7	2	1
M+İP L-NAME	10	5	4	1

(M: miringotomi, MS: miringoskleroz, SF: serum fizyolojik, tpk: topikal İP: intraperitoneal, L-NAME: N-Nitro L-Arjinin Metil Ester)

Histopatolojik miringoskleroz skorları değerlendirilirken gruplar arasında Fischer's Exact Test ile istatistiksel analiz yapılabilmesi için sonuçlar yok-seyrek (skoru 0 ve 1 olanlar) ve geniş (skoru 2 olanlar) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

Tablo 7. Gruplandırılmış histopatolojik miringoskleroz bulguları

GRUP	Histopatolojik Miringoskleroz				Toplam	
	Yok / Seyrek 0 / (+)		Geniş (++)			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
M	3	30.0	7	70.0	10	100.0
M+SF	3	37.5	5	62.5	8	100.0
M+tpk L-NAME	9	90.0	1	10.0	10	100.0
M+İP L-NAME	9	90.0	1	10.0	10	100.0

(M: miringotomi, SF: serum fizyolojik, tpk: topikal, İP: intraperitoneal, L-NAME: N-Nitro L-Arjinin Metil Ester)

Miringotomi sonrası tedavi verilmeyen M grubundaki 10 timpanik membranın tümünde miringoskleroz gelişirken, bunlardan yedisinde bir arada bulunan geniş sklerotik lezyonlar tespit edilmiştir. Topikal serum fizyolojik uygulanan M+SF grubunda ise sekiz timpanik membranın beşinde bir arada bulunan geniş sklerotik lezyonlar görülmüştür.

L-NAME ile tedavi edilen gruplara baktığımızda, topikal L-NAME uygulanan M+tpk L-NAME grubundaki 10 timpanik membranın yedisinde histopatolojik miringosklerozla rastlanmazken sadece birinde geniş sklerotik lezyon tespit edilmiştir. İntraperitoneal L-NAME uygulanan M+İP L-NAME grubunda ise beş timpanik membranda miringoskleroz saptanmazken dördünde seyrek, birinde ise geniş sklerotik lezyon varlığı saptanmıştır.

M ve M+SF grupları arasında histopatolojik miringoskleroz karşılaştırılması yapıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın bulunmadığı görülmüştür ($p=1.00$).

M+tpk L-NAME grubu ile M grubu arasında yapılan histopatolojik miringoskleroz karşılaştırmasında, M+tpk L-NAME grubunda miringosklerozun istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p=0.02$).

M+tpk L-NAME grubu ile M+SF grubu arasında yapılan histopatolojik miringoskleroz karşılaştırmasında, M+tpk L-NAME grubunda miringosklerozun M+SF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p=0.04$).

M+İP L-NAME grubu ile M grubu arasında yapılan histopatolojik miringoskleroz karşılaştırmasında, M+İP L-NAME grubunda miringosklerozun istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p=0.02$).

M+İP L-NAME grubu ile M+SF grubu arasında yapılan histopatolojik miringoskleroz karşılaştırmasında, M+İP L-NAME grubunda miringosklerozun M+SF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p=0.04$).

Topikal L-NAME uygulanan M+tpk L-NAME grubu ile intraperitoneal L-NAME uygulanan M+İP L-NAME grupları arasında ise histopatolojik miringoskleroz açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=1.00$).

7. TARTIŞMA

Miringoskleoz timpanik membran lamina propriasındaki kollajen yapının hiyalinizasyonu ve kalsifikasyonu ile karakterize bir durum olup sıklıkla efüzyonlu otitis media tedavisinde miringotomi yapılması ya da ventilasyon tüpü uygulamasını takiben ortaya çıkar (1-6). Miringoskleroz otoskopik muayenede timpanik membran üzerinde yerleşmiş değişik şekil ve boyutlardaki beyaz kalsifiye plaklar şeklinde görülür. Histolojik olarak incelendiğinde ise sklerotik lezyonların lamina propriadaki düzensiz kollajen lifler arasında yerleşmiş olan kalsiyum fosfat içerikli mineralize agregatlardan oluştuğu görülmektedir (50,51). Ateroskleroz gibi lamina propriada kalsifikasyonla seyreden hastalıkların timpanoskleroz ile olan ultrastrüktürel benzerlikleri histopatolojik incelemelerle ortaya konmuştur (52). Yapılan ışık ve elektron mikroskopu incelemelerinde her iki hastalıkta görülen ortak özellikler, lamina propriadaki kollajen fibrillerde artış, düzensiz yerleşimli kollajen lifler arasında yoğun kalsifikasyon ve fibroblast hakimiyetidir. Artmış kollajen sentezi, hiyalinizasyon ve kalsifikasyon sonucunda damar çeperi ve timpanik membranda oluşan kalınlık artışı dikkati çekmektedir.

İnsan kulağında sklerotik plakların en sık yerleşim yeri timpanik membran olmakla birlikte orta kulak mukozası, kemikçik zincir, mastoid hücreler ve iç kulak yapıları da etkilenebilir. Timpanik membrandaki sınırlı skleroz varlığı çoğunlukla asemptomatik seyretse de, timpanik membranı geniş olarak tutan, kemikçik zinciri, promontoriumu ve iç kulak yapılarını etkileyen sklerotik lezyonlar ileri işitme kayıplarına yol açabilir (3,6,44,53). Bu şekilde ileri işitme kayıplarına yol açan timpanosklerozlarda kesin tedavi sağlamak oldukça güçtür (53,54). Yapılan cerrahi tedavi sonrası rekürrenslerin oldukça sık görülmesi ve yüz güldürücü sonuçların alınamaması, araştırmacıları tedaviden çok timpanoskleroz oluşumunu önlemeye yönelik çalışmalar yapmaya yöneltmiştir (12,54). Bu amaçla yapılan birçok çalışmada timpanik membrandaki iyileşme ve miringoskleroz gelişim süreçleri incelenmiş, miringoskleroz gelişimine neden olan faktörler araştırılarak çeşitli tedavi seçenekleri denenmiştir.

Miringoskleroz gelişim mekanizmasını açıklamaya yönelik çeşitli hipotezler öne sürülmüştür. Tos ve ark. (55) normal titreşen timpanik membranda miringosklerozun

oluşmadığını, ventilasyon tüpü uygulaması sonrası azalan timpanik membran hareketinin, kollajen tabakada hiyalinizasyon ve kalsifikasyona zemin hazırladığını savunmuşlardır. Sklerotik lezyonların çoğunlukla zar hareketinin kısıtlı olduğu anulusa yakın periferal bölgelerde yerleştiğini, zar hareketinin maksimum olduğu santralde ise daha az bulunduğunu bildirmişlerdir. Başka bir hipotez ise miringotomi ve ventilasyon tüpü uygulaması sırasında oluşan fazla miktardaki kanamanın ve orta kulak sıvısının aspirasyonunun miringoskleroz gelişimine katkıda bulunduğunu ileri sürmektedir (56). Kanama sonrasında timpanik membran lamina propriasında biriken serbest hemoglobinin iritan etkisinin miringoskleroz gelişim sürecini başlattığı düşünülmektedir. Slack ve ark. (57) lokal travma ve kanama faktörleri dışında, ventilasyon tüpünün neden olduğu kitle artışının ve miringotomi insizyonunun yarattığı kan akımı değişikliklerinin miringoskleroz gelişimine katkı yapan diğer faktörler olduğu görüşündedirler.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ise, SOR'un yaratmış olduğu geri dönüşümsüz doku hasarının miringoskleroz gelişiminde başlıca neden olduğunu göstermektedir (3,4,7-9). Normalde % 5-10 arasında değişen orta kulak O₂ basıncı, miringotomi sonrası dış kulak yolundaki O₂ konsantrasyonuna çıkmakta ve orta kulakta göreceli bir hiperoksik ortam oluşmaktadır. Oluşan hiperoksik ortamın neden olduğu SOR salınımı sonucunda yoğun inflamasyon ve doku hasarı meydana gelmektedir. Doku hasarının iyileşme sürecinde ortaya çıkan irregüler kollajen sentezi ve bunun üzerine eklenen kalsifikasyon miringoskleroza neden olmaktadır (6,8,13).

SOR antioksidan özelliği olan maddeler tarafından etkisiz hale getirilebilmektedir. Deneysel çalışmalarda E vitamini, askorbik asit, selenyum, N-asetil sistein ve L-karnitin gibi antioksidan özelliği olan maddelerin uygulanması ile miringoskleroz oluşumunun önlenebileceği gösterilmiştir (3,4,7,9). Bu alanda yapılan deneysel çalışmalara bakıldığında, miringoskleroz gelişimine neden olan sürecin timpanik membran arka-üst kadrana yapılan miringotomi ile başlatıldığı görülmektedir. Bu çalışmalarda enfeksiyon oluşturulmuş ve/veya sağlıklı timpanik membranlar kullanılabilirle birlikte, sağlıklı timpanik membranlara yapılan miringotomi daha çok tercih edilmektedir. Biz çalışmamızda, otomikroskopik bakıda sağlıklı görünen timpanik membranlara arka-üst kadrandan yaptığımız miringotomi ile miringoskleroz oluşturmayı amaçladık. Ondördüncü günde yaptığımız otomikroskopik

ve histopatolojik bakı sonucunda, miringotomi sonrası tedavisiz bıraktığımız timpanik membranların hepsinde miringoskleroz geliştiğini gördük.

Mattsson ve ark. (58) yaptıkları deneysel çalışmada akut otitis media oluşturulan ve enfeksiyonun olmadığı kulaklarda ayrı ayrı yapılan miringotomin miringoskleroz gelişimine olan katkısını incelemişler; her iki grupta eşit düzeyde miringoskleroz geliştiğini görmüşlerdir. Bunun yanında miringotomi yapılmadan spontan iyileşmeye bırakılan enfeksiyonlu timpanik membranlarda ise miringoskleroz gelişmediğini görmüşlerdir. Bu nedenle sadece enfeksiyona sekonder gelişen inflamatuvar sürecin miringoskleroz gelişimi için yeterli bir neden olmadığı düşünülmüştür. Yapılan miringotomi sonrası orta kulakta oluşan SOR'un yarattığı doku hasarının ve inflamasyonun miringoskleroz oluşumunda asıl neden olduğu savunulmuştur.

Hiperoksik ortamın miringoskleroz oluşumuna katkısını araştırmak amacıyla yapılan başka bir çalışmada miringotomi yapılan ratlar, farklı O₂ konsantrasyonlarında tutulmuşlardır (11). Yüzde 40 gibi yüksek O₂ konsantrasyonunda tutulan ratlarda, normal atmosfer basıncında tutulanlara göre daha yoğun miringoskleroz geliştiği tespit edilmiştir. Bu çalışma, hiperoksik ortamda salınan SOR'un yarattığı doku hasarının miringoskleroz oluşumuna neden olan en önemli faktör olduğunu savunmaktadır. Bu hipotezi destekleyen diğer çalışmada ise, miringotomi yapıldıktan sonra hiperoksik ortamda tutulan ratlara uygulanan süperoksit dismutaz ve deferoksamin gibi SOR tutucu maddelerin miringoskleroz oluşumunu önlediği gösterilmiştir (13). Süperoksit dismutaz ve deferoksamin, serbest bir radikal olan süperoksiti etkisiz hale getirmekte ve hücreyi geri dönüşümsüz hasardan korumaktadır. Hiperoksik ortamda ortaya çıkan süperoksit radikalinin, akut inflamasyon sırasında yüksek miktarda sentezlenen NO ile reaksiyona girmesi sonucunda çok toksik bir serbest radikal olan peroksinitrit oluşmaktadır. NO'nun toksik etkilerinin ortaya çıkmasından asıl sorumlu olan ajan peroksinitrittir. Süperoksit dismutaz ise süperoksit radikalinin detoksifikasyonundan sorumlu olan antioksidan bir enzimdir. Süperoksit dismutazın, süperoksit radikalini ortamdaki uzaklaştırması sonucunda, NO'nun süperoksitle reaksiyona girmesi ve peroksinitrit oluşturması önlenir. Bu şekilde peroksinitritin doku hasarı oluşturucu etkisinin önüne geçilmiş olunur.

İnflamasyon sırasında ortaya çıkan peroksinitritin yarattığı doku hasarının iyileşmesi fibrozis ile sonuçlanmaktadır. Bu süreçte timpanik membranın lamina propriasında fibroblastik aktivite artışı, irregüler kollajen sentezi ve hiyalinizasyon meydana gelmektedir. Hiyalinizasyon sonrası oluşan kalsifikasyonla birlikte sklerotik plakların oluşumu tamamlanmaktadır.

Biz, çalışmamızda peroksinitrit oluşumunu L-NAME kullanarak önlemeyi tercih ettik. Daha önce pek çok dokuda antiinflamatuvar, antioksidan ve antifibrotik etkileri gösterilmiş olmasına karşın timpanik membrandaki yara iyileşmesi konusunda hiç çalışılmamış olması, L-NAME tercihimizin nedenleri arasındaydı. L-NAME ile NO sentezini baskılamayı, süperoksit radikalinin NO ile reaksiyona girmesini ve peroksinitrit oluşumunu önlemeyi hedefledik. Bu şekilde, peroksinitritin yarattığı doku hasarının önüne geçerek miringoskleroz oluşumunu engellemeyi amaçladık.

Sklerotik plakların oluşumundaki en son aşama olan kalsifikasyon sürecinin vücutta yeni kemik oluşumu sırasında görülen remineralizasyon ve kalsifikasyon süreci ile benzerlik gösterdiği düşünülmektedir. Gingivitis ve artrit gibi bazı infeksiyöz ve inflamatuvar hastalıklarda görülen yeni kemik dokusu oluşum süreci immatür kemik matriksinin kalsifikasyonu ile başlamaktadır (59). Bu süreç, miringoskleroz gelişimi sırasında hiyalinize lamina propriada meydana gelen kalsifikasyonla benzerlik göstermektedir. Miringotomi sonrası oluşan inflamasyon sırasında sayıca artan makrofaj ve fibroblastlar tarafından eksprese edilen osteopontin ve osteonektin gibi proteinlerin aktivasyonu sonucunda lamina propriada kalsiyum birikiminin olduğu gösterilmiştir (60).

Forseni Flodin, (61) deneysel akut otitis mediada timpanoskleroza neden olan süreci incelemiş; inflamasyon sırasında bullar kemikte görülen yoğun osteoklastik ve osteoblastik aktivite sonucunda meydana gelen kemik yıkım ve yeniden yapım sürecinin timpanoskleroza sonuçlandığını belirtmiştir. İnflamasyonun erken döneminde aktive olan makrofajlar tarafından interlökin-6 ve NO gibi bazı mediatörler üretilmektedir. Bu mediatörlerin indüklediği inflamasyon sırasında makrofajların osteoklastik hücre diferansiasyonuna uğradığı ve kemik rezorpsiyonunun olduğu düşünülmektedir. NO'nun osteoklastik kemik rezorpsiyonuna neden olan mediatör olduğunu savunan diğer çalışma Chole ve ark. tarafından yapılmıştır (62). Bu

çalışmada, sistemik olarak uygulanan L-NAME'nin NO sentezini azaltarak kemik yıkımını engellediği gösterilmiştir.

Miringoskleroz gelişimini önlemede, L-NAME'yi tercih etmemizin nedenlerinden biri de literatürde NO'nun kalsifikasyon oluşum sürecinde rol alan önemli bir mediatör olduğunun gösterilmiş olmasıdır (61,62). NO üretiminin azaltılmasıyla sklerotik plakların oluşumundaki son aşama olan kalsifikasyonun önüne geçilebilir. Çalışmamızda histopatolojik miringoskleroz dikkate alındığında, L-NAME'nin miringosklerozu M+tpk L-NAME ve M+İP L-NAME gruplarında, M ve M+SF gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir. Miringotomi sonrası topikal ve intraperitoneal olarak uyguladığımız L-NAME'nin peroksinitrit oluşumunu önleyerek doku hasarını azaltmasının yanında kollajen matriksteki kalsifikasyonu da azaltarak miringoskleroz gelişimini engellediğini düşünmekteyiz.

Literatürde L-NAME kullanılan çalışmalar incelendiğinde, L-NAME'nin dozu ve uygulama süresi ile ilgili net bir fikir birliğinin olmadığını görmekteyiz. Bu durum L-NAME'nin nonspesifik bir NOS inhibitörü olmasından kaynaklanmaktadır. iNOS sadece patolojik süreçlerde ortaya çıkmakta iken, eNOS ve nNOS fizyolojik olayların sürdürülebilmesi için bazal miktarlarda ve devamlı üretilmektedir. İnflamasyon sırasında aktive olan iNOS, eNOS ve nNOS'tan yaklaşık 1000 kat daha fazla NO üretebilmektedir (16,41). Bu nedenle tedavi amaçlı kullanılan NOS inhibitörlerinin asıl hedefi, inflamasyonda ortaya çıkan ve yüksek miktarda NO sentezinden sorumlu olan iNOS'tur. Maksimum iNOS inhibisyonu sağlarken, eNOS ve nNOS aktivitesini etkilemeyen doz ve süredeki kullanım, tedavi planlamasındaki en önemli noktadır.

Literatürde timpanik membran yara iyileşme sürecinde iNOS ve NO'nun zamana bağımlı sentezini ortaya koyan çalışma bulunmamaktadır. Timpanik membran yara iyileşme sürecinde iNOS ve NO'nun zamana bağımlı sentezinin incelenmesi, inflamasyon fazında maksimum iNOS inhibisyonunun yapılabileceği zaman aralığının saptanmasını sağlayacaktır. Bu zaman aralığında uygulanan L-NAME ile optimal tedavi etkinliği sağlanabilir.

Yapılan çalışmalarda iNOS'un farklı dokularda oluşturulan inflamasyon süreçlerindeki zamana bağımlı sentezi incelenmiş, maksimum iNOS inhibisyonu sağlamak için farklı doz ve sürelerde NOS inhibitörleri kullanılmıştır (16,21,22).

Liu ve ark. (63) ratlarda lipopolisakkarid ile indüklenen inflamasyonda iNOS sentezini incelemişler, lipopolisakkarid enjeksiyonunu takiben iki saat içerisinde iNOS üretiminin başladığını, 12. saatte maksimum seviyeye ulaştığını ve daha sonra giderek azaldığını göstermişlerdir. Kim ve ark. (16) intratimpanik lipopolisakkarid enjeksiyonu ile efüzyonlu otitis media oluşturulan ratlara verilen intraperitoneal L-NAME'nin inflamasyonu ve vasküler permeabiliteyi azaltarak efüzyon gelişimini engellediğini göstermişlerdir. Bu çalışmada L-NAME, iNOS aktivitesini önlemeye yönelik olarak lipopolisakkarid enjeksiyonundan hemen sonra ve enjeksiyon sonrası 12. saatte uygulanmıştır.

Efron ve ark. (21) ise ratlarda kolon anastomozu sonrası oluşan iyileşme sürecindeki zamana bağımlı iNOS sentezini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada, maksimum iNOS sentezinin postoperatif birinci günde yapıldığını, birinci günden sonra ise giderek azaldığını görmüşlerdir. iNOS yara iyileşmesinin inflamasyon fazında ortaya çıkan yüksek miktardaki NO sentezinden sorumludur. İnflamasyon fazından sonra ise aktivitesi azalarak kaybolmaktadır. Bu sonuç bize L-NAME ile sağlanan maksimum iNOS inhibisyonunun, inflamasyonun erken dönemine denk gelen ilk 24 saatte sağlanabileceğini düşündürmektedir.

Bu düşüncemizi destekleyen bir çalışmada, insizyonel cilt hasarı oluşturulan ratların yara dokusunda iNOS aktivitesi ölçülmüş ve NOS inhibitörü ile maksimum iNOS inhibisyonunun sağlandığı zaman aralığı tespit edilmiştir. Yapılan analizlerde yara oluşumu sonrası iNOS aktivitesinin 24. saatte maksimum seviyeye ulaştığı ve maksimum iNOS inhibisyonunun ilk 24 saatte sağlandığı gösterilmiştir (22).

Biz, çalışmamızda miringotomi sonrası iNOS aracılığıyla yüksek miktarlarda sentezlenen NO'nun indüklediği aşırı inflamasyon ve doku hasarının ilk 24 saatte oluştuğunu düşünerek, L-NAME'yi miringotomiden hemen sonra, miringotomi sonrası 12. saatte ve 24. saatte olmak üzere üç kez uyguladık. L-NAME ile eNOS ve nNOS aktivitesini etkilemeden maksimum iNOS inhibisyonunu sağlamayı, bu şekilde aşırı NO sentezini önleyerek timpanik membran lamina propriasındaki inflamatuvar cevabı azaltmayı planladık.

Çalışmamızda lamina propriadaki inflamasyon dikkate alındığında, miringotomi sonrası tedavisiz bırakılan grupta % 70 olan orta-şiddetli inflamasyon oranı, topikal serum fizyolojik uygulanan grupta % 62.5 olarak tespit edilmiştir. Bu oran topikal L-

NAME grubunda % 10, intraperitoneal L-NAME grubunda ise % 0'dır. Bu sonuçlar L-NAME'nin hem topikal hem de sistemik etki ile inflamatuvar cevabı baskıladığını göstermiş olup, literatürde söz edilen antiinflamatuvar etkisini desteklemektedir.

NO, yara oluşumu sonrası erken dönemde inflamatuvar cevabı arttırarak doku hasarı oluşturucu etkiler gösterse de, inflamasyon fazı sonrası ortaya koyduğu faydalı etkilerle yara iyileşmesinin sağlıklı bir şekilde tamamlanmasını sağlamaktadır. NO'nun inflamasyon fazında göstermiş olduğu doku hasarını artırıcı etkiden peroksinitrit sorumludur (64). Deri başta olmak üzere birçok farklı dokudaki yara iyileşme modellerinde yapılan analizlerde, NO üretiminin sadece inflamasyon fazında yapılmadığı, inflamasyon fazından sonra azalarak devam ettiği gösterilmiştir. İnflamasyon fazı sonrasında daha düşük konsantrasyonlarda üretilen NO, angiogenez, proliferasyon, matriks depolanması ve remodelasyon fazlarında etki gösterir. İnflamasyon fazı sonrası yara bölgesine göç eden fibroblastlarda iNOS ve eNOS ekspresyonunun yapıldığı, iNOS ve eNOS aracılığıyla sentezlenen NO'nun kollajen sentezini artırarak fibröz tabakanın yeniden şekillenmesini sağladığı bilinmektedir (64,65).

Artmış NO sentezi ise keloid ve hipertrofik skar dokusu oluşumuna neden olmaktadır (66,67). Yapılan çalışmalarda yara oluşumu sonrası uygulanan L-NAME'nin kollajen sentezini baskılayarak skar oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (22).

NO'nun farklı dokulardaki yara iyileşmesinde kollajen sentezini sağlayan mediatör olduğunun gösterilmesi, timpanik membran yara iyileşme sürecinde de benzer etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir. SOR'un yarattığı inflamasyon ve doku hasarı sonrası başlayan iyileşme sürecinde görülen en dikkat çekici özellik artmış fibroblastik aktivitedir. Fibroblastik aktivite sonucunda ortaya çıkan yoğun kollajen sentezi ve fibrotik iyileşme timpanik membran kalınlığının artmasına ve zarın elastik yapısının kaybolmasına neden olmaktadır. NO sentezinin inhibe edilmesi, aşırı kollajen sentezinin ve fibrozisin azalmasına neden olacaktır.

Çalışmamızda, topikal ve intraperitoneal L-NAME uygulanan gruplardaki ortalama timpanik membran kalınlığının, tedavisiz bırakılan ve topikal serum fizyolojik uygulanan gruplara göre istatistiksel anlamlı olarak daha az olduğu gösterilmiştir. Topikal ve intraperitoneal L-NAME uygulanan gruplar arasında ise anlamlı farklılık bulunmamıştır. Topikal ve/veya sistemik uygulanan L-NAME'nin lamina propriadaki

fibroblastik aktiviteyi baskılayarak kollajen sentezini azaltması timpanik membran kalınlığının daha az olmasına neden olmaktadır. Kollajen depolanmasının azaltılması sonucunda hiyalinizasyon önlenmekte ve miringoskleroz gelişimi engellenmektedir. L-NAME'nin miringoskleroz gelişimini önlemede, daha önce söz edilen doku hasarını ve kalsifikasyonu azaltması dışında, göstermiş olduğu üçüncü önemli etkisi lamina propriadaki kollajen depolanmasını ve fibrozisi azaltmasıdır.

Sonuç olarak çalışmamızda, L-NAME'nin diğer dokularda gösterilen antiinflamatuvar ve antifibrotik davranışını, timpanik membran dokusundaki yara iyileşme sürecinde de sergilediği ortaya konmuştur. Bu etkileriyle rat timpanik membranında miringoskleroz gelişimini önlediğini göstermiş olduğumuz L-NAME, miringotomi yapılması ya da ventilasyon tüpü uygulaması sonrası görülebilen miringosklerozun önlenmesinde iyi bir tedavi alternatifi olabilir. Ancak klinik uygulama bulması için daha ileri ve geniş kapsamlı çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır.

8. SONUC

Çalışmamızda, yapılan miringotomi sonrası iNOS aracılığıyla sentezlenen NO'nun indüklediği aşırı inflamasyon ve doku hasarının ilk 24 saatte olduğu kabul edilerek L-NAME; miringotomiden hemen sonra, miringotomi sonrası 12. saatte ve 24. saatte topikal ve intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Elde edilen bulgulara göre ilk 24 saatte uygulanan L-NAME'nin, hem M+tpk L-NAME hem de M+İP L-NAME grubunda, yapılan miringotomiye cevap olarak ortaya çıkan inflamasyonu belirgin olarak baskıladığı görülmüştür.

L-NAME ile inflamatuvar cevabın baskılanması, inflamasyon fazında oluşan doku hasarının şiddetinin azalmasına neden olmaktadır. Böylece doku hasarına cevap olarak ortaya çıkan fibroblastik reaksiyonun ve aşırı kollajen sentezinin önüne geçilebilmektedir.

Histopatolojik miringoskleroz dikkate alındığında, L-NAME'nin miringoskleroza M+tpk L-NAME ve M+İP L-NAME gruplarında, M ve M+SF gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, miringotomi sonrası uygulanan L-NAME'nin antiinflamatuvar, antifibrotik ve kalsifikasyonu önleyici etkileriyle miringoskleroza azalttığını göstermektedir.

Araştırmamızda topikal ve intraperitoneal L-NAME uygulanan gruplardaki ortalama timpanik membran kalınlığının, tedavisiz bırakılan ve topikal serum fizyolojik uygulanan gruplara göre istatistiksel anlamlı olarak düşük düzeyde kaldığı görülmüştür. L-NAME'nin inflamasyonu ve kollajen sentezini azaltması, timpanik membran kalınlığının daha az olmasına neden olmaktadır. Ancak çalışmamızda L-NAME uygulanan timpanik membranların, miringotomi yapılmamış sağlıklı timpanik membranlar ile karşılaştırılması yapılmamıştır. Bu nedenle normal dokuyla kıyaslandığında en az farkla iyileşmeyi sağlayacak optimum doz ve tedavi süresinin saptanması için, L-NAME'nin farklı doz ve sürelerde kullanıldığı geniş kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

9. KAYNAKLAR

1. Mattsson C, Stierna P, Hellstrom S. Treatment with dexamethasone arrests the development of myringosclerosis after myringotomy. *Am J Otol* 2000;21:804-8.
2. Forseni M, Hansson GK, Bagger-Sjöback D, Hultcrantz M. An immunohistochemical study of inducible nitric oxide synthase in the rat middle ear, with reference to tympanosclerosis. *Acta Otolaryngol* 1999;119:577-82.
3. Akbaş Y, Pata YS, Görür K, Polat G, et al. The effect of L- carnitine on the prevention of experimentally induced myringosclerosis in rats. *Hear Res* 2003;184:107-12.
4. Spratley JE, Hellström SO, Mattsson C, Pais-Clemente M. Topical ascorbic acid reduces myringosclerosis in perforated tympanic membranes. A study in rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001;110: 585-91.
5. Russell JD, Giles JJ. Tympanosclerosis in the rat tympanic membrane: An experimental study. *Laryngoscope* 2002;112:1663-6.
6. Görür K. Timpanoskleroz ve miringosklerozun etiyopatogenezi. *Otoscope* 2004;4:125-9.
7. Özcan C, Görür K, Cinel L, Talas DU, et al. The inhibitory effect of topical N-acetylcysteine application on myringosclerosis in perforated rat tympanic membrane. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002;63:179-84.
8. Song JJ, Kwon SK, Cho CG, Park SW. The effect of caffeic acid phenethyl ester on the prevention of experimentally induced myringosclerosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007;71:1287-91.

9. Polat S, Öztürk Ö, Üneri C, Yüksel M, et al. Determination of reactive oxygen species in myringotomized tympanic membranes: Effect of vitamin E treatment. *Laryngoscope* 2004;114:720-5.
10. Mattsson C, Hellström S. Inhibition of the development of myringosclerosis by local administration of fenspiride, an anti-inflammatory drug. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1997;254:425-9.
11. Mattsson C, Magnuson K, Hellström S. Myringosclerosis caused by increased oxygen concentration in traumatized tympanic membrane. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:625-32.
12. Karlıdağ T, İlhan N, Kaygusuz İ, Keleş E, et al. Comparison of free radicals and antioxidant enzymes in chronic otitis media with and without tympanosclerosis. *Laryngoscope* 2004;114:85-9.
13. Mattsson C, Marklund SL, Hellström S. Application of oxygen free radical scavengers to diminish the occurrence of myringosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:513-8.
14. Muijsers R, Folkerts G, Henricks P, Sadeghi-Hashjin G. Peroxynitrite: A two-faced metabolite of nitric oxide. *Life Sciences* 1997;60:1833-45.
15. Jeon EJ, Park YS, Lee SK, Yeo SW, et al. Effect of nitric oxide and peroxynitrite on mucociliary transport function of experimental otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;134:126-31.
16. Kim DH, Park YS, Jeon EJ, Yeo SW, et al. Effects of tumor necrosis factor alpha antagonist, and nitric oxide synthase inhibitor on experimental otitis media with effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006;115:617-23.

17. Nordang L, Anniko M. Nitro-L-arginine methyl ester: a potential protector against gentamicin ototoxicity. *Acta Otolaryngol* 2005;125:1033-8.
18. Watanabe K, Hess A, Bloch W, Michel O. Inhibition of inducible nitric oxide synthase lowers the cochlear damage by lipopolysaccharide in guinea pigs. *Free Radic Res* 1999;32:363-70.
19. Watanabe KI, Hess A, Bloch W, Michel O. Nitric oxide synthase inhibitor suppresses the ototoxic side effect of cisplatin in guinea pigs. *Anticancer Drugs* 2000;11:401-6.
20. Darmani H, Crossan JC, Curtis A. Single dose of inducible nitric oxide synthase inhibitor induces prolonged inflammatory cell accumulation and fibrosis around injured tendon and synovium. *Mediators of Inflammation* 2004;13:157-64.
21. Efron DT, Thornton FJ, Steultens C, Tantry US, et al. Expression and function of inducible nitric oxide synthase during rat colon anastomotic healing. *J Gastrointest Surg* 1999;3:592-601.
22. Lee RH, Efron D, Tantry U, Barbul A. Nitric oxide in the healing wound: A time-course study. *J Surg Res* 2001;101:104-8.
23. Schaffer MR, Tantry U, Thornton FJ, Barbul A. Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice. *Eur J Surg* 1999;165:262-7.
24. Takeuchi K, Hatazawa R, Tanigami M, Tanaka A, et al. Role of endogenous nitric oxide and nitric oxide synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats. *Life Sci* 2007;80:329-36.
25. Akyıldız N. Temporal kemik ve işitme organının anatomisi. Akyıldız N. ed. *Kulak hastalıkları ve mikrocerrahisi 1*. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi 1998:32-5.

26. Castagno LA, Lavinsky L. Tympanic membrane healing in myringotomies performed with argon laser or microknife: an experimental study in rats. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)* 2006;72:794-99.
27. Stenfeldt K, Johansson C, Hellström S. The collagen structure of the tympanic membrane: Collagen types I, II, and III in the healthy tympanic membrane, during healing of a perforation, and during infection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;132:293-8.
28. Schmidt SH, Hellström S. Tympanic membrane structure-new views: a comparative study. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1991;53:32-6.
29. Güneri EA, Tekin S, Yılmaz O, Ozkara E, et al. The effects of hyalunoric acid, epidermal growth factor and mitomycin in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol* 2003;24:371-6.
30. Oktay MF, Cureoğlu S, Schachern PA, Paparella MM, et al. Tympanic membrane changes in central tympanic membrane perforations. *Am J Otolaryngol* 2005;26:393-7.
31. Johnson AP, Smallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1990;109:406-15.
32. Spratley J, Hellström S, Eriksson PO, Pais-Clemente M. Early structural tympanic membrane reactions to myringotomy: a study in an acute otitis media model. *Acta Otolaryngol* 2002;122:479-87.
33. Magnuson K, Hermansson A, Hellström S. Healing of tympanic membrane after myringotomy during streptococcus pneumoniae otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105:397-404.

34. Wang WQ, Wang ZM, Chi FL. Spontaneous healing of various tympanic membrane perforations in the rat. *Acta Otolaryngol* 2004;124:1141-4.
35. Yamaguchi Y, Yoshikawa K. Cutaneous wound healing: an update. *J Dermatol* 2001;28:521-34
36. Mondain M, Ryan A. Histological study of the healing of traumatic tympanic membrane perforation after basic fibroblast growth factor application. *Laryngoscope* 1993;103:312-8.
37. Mattsson C, Johansson C, Hellström S. Myringosclerosis develops within 9 hours of myringotomy. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1999;61:31-6.
38. Santos PF, Leal MC, Peixoto C, Caldas NS, et al. Otomicroscopic and histologic findings of induced myringosclerosis in rats: a critical study of an experimental model. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)* 2005;71:668-74.
39. John EO, Russell PT, Nam BH, Jinn TH, et al. Concentration of nitric oxide metabolites in middle ear effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2001;60:55-8.
40. Southan GJ, Szabo C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol* 1996; 51:383-94.
41. Ryan AF, Bennett T. Nitric oxide contributes to control of effusion in experimental otitis media. *Laryngoscope* 2001;111:301-6.
42. Xia Y, Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Medical Sciences* 1997;94:6954-8.
43. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite – induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991;288:481-7.

44. Forseni Flodin M, Hultcrantz M. Possible inflammatory mediators in tympanosclerosis development. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002;63:149-54.
45. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J Physiol* 1996;271:1424-37.
46. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Hake P, Salzman AL, et al. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic Biol Med* 1998;24:450-9.
47. Szabo C, Ferrer-Sueta G, Zingarelli B, Southan GJ, et al. Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. *J Biol Chem* 1997;272:9030-6.
48. Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, et al. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur J Immunol* 1994;24:672-6.
49. Naragni M, Deroee AF, Ebrahimkhani M, Kaini S, et al. Nitric oxide: a new concept in chronic sinusitis pathogenesis. *Am J Otolaryngol* 2007;28:334-7.
50. Selçuk A, Ensari S, Sargın AK, Can B, et al. Histopathological classification of tympanosclerotic plaques. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008;265:409-13.
51. Döner F, Yarıktaş M, Doğru H, Uzun H, et al. The biochemical analysis of tympanosclerotic plaques. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;128:742-5.
52. Koç A, Üneri C. Ultrastructural comparison between tympanosclerosis and atherosclerosis. *Türk Otolarengoloji Arşivi* 2005;43:137-44.

53. Akyıldız N. Timpanoskleroz. Akyıldız N. ed. Kulak hastalıkları ve mikrocerrahisi 1. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi 1998:461-72.
54. Asiri S, Hasham A, al Anazy F, Zakzouk S, et al. Tympanosclerosis: review of literature and incidence among patients with middle ear infection. *J Laryngol Otol* 1999;113:1076-80.
55. Tos M, Bonding P, Poulsen G. Tympanosclerosis of the ear drum in secretory otitis media after insertion of grommets: a prospective, comparative study. *J Laryngol Otol* 1983;97:489-96.
56. McRae D, Gatland DJ, Youngs R, Cook J. Aspiration of middle ear effusions prior to grommet insertion an etiological factor in tympanosclerosis. *J Otolaryngol* 1989;18:229-31.
57. Slack RW, Maw AR, Capper JW, Kelly S. Prospective study of tympanosclerosis developing after grommet insertion. *J Laryngol Otol* 1984;98:771-4.
58. Mattsson C, Magnuson K, Hellström S. Myringotomy: A prerequisite for the development of myringosclerosis? *Laryngoscope* 1998;108:102-6.
59. Caye-Thomasen P, Hermansson A, Tos M, Prellner K. Bone modeling dynamics in acute otitis media. *Laryngoscope* 1999;109:723-9.
60. Raustyte G, Caye-Thomasen P, Hermanson A, Andersen H, et al. Calcium deposition and expression of bone modelling markers in the tympanic membrane following acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006;70:529-39.
61. Forseni Flodin M. Macrophages and possible osteoclast differentiation in the rat bullar bone during experimental acute otitis media, with reference to tympanosclerosis. *Otol Neurotol* 2001;22:771-5.

62. Chole RA, Tinling SP, Leverentz E, McGinn MD. Inhibition of nitric oxide synthase blocks osteoclastic bone resorption in adaptive bone modeling. *Acta Otolaryngol* 1998;118:705-11.
63. Liu SF, Barnes PJ, Evans TW. Time course and cellular localization of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression in the rat in vivo. *Crit Care Med* 1997;25:512-8.
64. Soneja A, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep* 2005;57:108-19
65. Luo JD, Chen AF. Nitric oxide: a new discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26:259-64.
66. Cobbold CA. The role of nitric oxide in the formation of keloid and hypertrophic lesions. *Med Hypotheses* 2001;57:497-502.
67. Hsu YC, Hsiao M, Wang LF, Chien YW, et al. Nitric oxide produced by iNOS is associated with collagen synthesis in keloid scar formation. *Nitric Oxide* 2006;14:327-34.

