

**T. C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RATLARDA İNTRAPERİTONEAL OLARAK VERİLEN
EPİGALLOKATEŞİN-3-GALLAT'IN PERFORE TİMPANİK
MEMBRANLARDAKİ MİRİNGOSİKLERÖZ ÜZERİNE ETKİSİ**

**TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. İlhami YILDIRIM**

**Dr. Yusuf YILDIRIM
UZMANLIK TEZİ**

KAHRAMANMARAŞ/2013

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim suresince mesleki konulardaki bilgi birikimini ve tecrübelerini buyuğk sabır ve özveriyle aktaran, cerrahi ve teorik bilgilerimin gelişmesinde buyuğk katkıları olan, insani değerleri ile örnek aldığım tezimin danışmanlığını yapan değerli hocam Sayın Prof. Dr. İlhami YILDIRIM'a,

İhtisasım suresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, derin hoşgörü anlayışı ve deneyimi ile eğitimimi yönlendiren, iyi bir hekim olarak yetişmem için gayret gösteren hocam Sayın Prof. Dr. M. Akif KILÇ'a,

Asistanlığımın son dönemlerinde çalışmaya başladığım bilgi ve birikimlerinden faydalandığım Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Kelleş 'e,

Özverili çalışmalarından dolayı Sayın Doç. Dr. Harun ÇIRALIK'a,

Tez çalışmam sırasındaki katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN'a,

Eğitimim suresince sevgi ve dostluklarını benden esirgemeyen, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde buyuğk pay sahibi olan, desteklerini benden hiç bir zaman esirgemeyen aileme,

Tuğm mesleki ve özel yaşamımda hep yanımda olan ve hep yanımda olacağına inandığım hayat arkadaşım, sevgili eşim Makbule Nur YILDIRIM'a
En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II-III
TABLolar LİSTESİ	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
KISALTMALAR LİSTESİ	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Anatomik yapı	2
2.1.1. Kulak zarının yapısı	2
2.1.1.1. Kulak zarının arterleri	3
2.1.1.2. Kulak zarının inervasyonu	3
2.1.1.3. İnsan ve rat kulak zarları arasındaki farklar	3
2.1.2. Orta kulak	4
2.2. Timpanik Membranın Histolojik Yapısı	6
2.3. Perfore Timpanik Membranın İyileşme Mekanizması	6
2.4. Miringoskleroz Oluşumu	7
2.5. Radikal Kavramı Ve Oksijen Radikalleri	8
2.5.1. Serbest radikallerin oluşumu	9
2.5.1.1. Kovalent bağın homolitik ayrılması	9
2.5.1.2. Bir molekülün elektron kaybetmesi	9
2.5.1.3. Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi	10
2.5.2. Reaktif oksijen metabolitlerinin kaynakları	10
2.5.2.1. Elektron transport zinciri	10
2.5.2.2. Enzimatik tepkimeler	10
2.5.2.3. Enzimatik olmayan tepkimeler	11
2.5.2.4. Dış etmenler	11
2.5.3. Reaktif oksijen metabolitlerinin biyolojik etkileri ve hücre hasarı	11
2.5.4. Antioksidan savunma	12
2.5.4.1. Enzimatik antioksidan savunma sistemleri	13
2.5.4.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)	13

2.5.4.1.2.Katalaz (CAT)	13
2.5.4.1.3. Glutatyon redüktaz (GR) ve Glutatyon Peroksidaz (GPx)	13
2.5.4.2. Enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri	14
2.5.4.2.1 Metal iyonlarının etkisizleştirilmesini sağlayan antioksidanlar	14
2.5.4.2.2. İn vivo sentezlenebilen düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar	14
2.5.4.2.3. Diyetle alınan düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar	14
2.5.4.2.4. Kerotenoidler ve fenolik yapılar	15
2.6. Malondialdehit (MDA)	15
2.7. Epigallokateşin-3-Gallate (EGCG)	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Miringotomi	18
3.2. Çalışma grupları	18
3.2.1. Birinci grup = Miringotomi (M)	18
3.2.2. İkinci grup= Miringotomi + Serum Fizyolojik(SF) (M+SF)	19
3.2.3. Üçüncü grup= Miringotomi + EGCG (M+EGCG)	19
3.3. Kanların alınıp CAT, SOD, MDA ve GPX düzeylerinin çalışılması	19
3.4. Histopatolojik İnceleme	20
3.5. İstatistiksel analiz	22
4. BULGULAR	23
4.1. Otomikroskopik Değerlendirme	23
4.2. Histopatolojik Değerlendirme	25
4.3. Biyokimyasal Analiz	26
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇ	34
7. KAYNAKLAR	35

TABLULAR LİSTESİ

Tablo No:	Sayfa No:
Tablo-1. Reaktif oksijen ve azot partikülleri.	9
Tablo-2 . Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar.	12
Tablo-3. Gruplardaki her bir kulağın otomikroskopik miringoskleroz skoru.	23
Tablo-4. Otomikroskopik değerlendirme bulguları.	23
Tablo-5. Çalışmadaki her bir kulağın histopatolojik değerlendirme sonuçları.	25
Tablo-6. Histopatolojik olarak gruplardaki miringoskleroz skorlarının değerlendirilmesi.	26
Tablo-7. Rat kanlarında çalışılan CAT, MDA, SOD, GPx düzeyleri.	27

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No:	Sayfa No:
Şekil-1. Kulak zarının lateralden görünümü.	2
Şekil-2. Rat ve insan kulak zarının karşılaştırmalı şekli.	4
Şekil-3. Orta kulağın komşulukları.	5
Şekil-4. Haber-Weiss tepkimesi.	10
Şekil-5. Serbest radikallerin hücresel kaynakları ve şematik olarak hasarı.	11
Şekil-6. Süperoksit radikalinin hidrojen peroksitde dönüşümü.	13
Şekil-7. Hidrojen peroksitin suya dönüşümü.	13
Şekil-8. Glutasyon peroksidazın hidrojen peroksidi suya indirgemesi.	14
Şekil-9. Glutasyon redüktazın glutasyonu indirgeme tepkimesi.	14
Şekil-10. Epigallocatechin-3-gallate'nin (EGCG) moleküler yapısı.	17
Şekil-11. Miringotomi yapılma aşaması.	18
Şekil-12. Çıkarılan rat bullası.	19
Şekil-13. M+EGCG grubundan örnek kesit.	21
Şekil-14. M+SF grubundan örnek kesit.	21
Şekil-15. M grubundan örnek kesit.	22
Şekil-16. M+ EGCG grubunda miringsklerozun olmadığı kulak zarı.	24
Şekil-17. M+SF grubunda hafif derecede miringskleroz.	24
Şekil-18. M grubunda şiddetli derecede miringskleroz.	24

KISALTMALAR LİSTESİ

- EGCG: Epigallokateşin-3-gallat
- MDA: Malondialdehid
- SOD: Süperoksid dismutaz
- CAT: Katalaz
- GPx: Glutasyon peroksidaz
- MS: Miringoskleroz
- GR: Glutadyon redüktaz
- M: Miringotomi
- SF: Serum fizyolojik
- FAD: Flavin adenin dinükleotid
- NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid
- NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit hidrojenaz
- NADPH: Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
- ATP: Adenozin trifosfat
- ROP: Radikal oksijen partikülü
- İP: İntraperitoneal
- H₂O₂: Hidrojen peroksid
- PUFA: Poliansatüre serbest yağ asidi
- GSSG: Yükseltgenmiş glutasyon
- GSH: İndirgenmiş glutasyon
- LDL: Düşük dansiteli lipoprotein
- RPM: Dakika devir sayısı
- NAC: N-asetilsistein

ÖZET

Effüzyonlu otoitis media'lı hastalarda ventilasyon tüpü takılmasının komplikasyonlarından biri de miringosklerozdur. Kulak zarında meydana gelen miringoskleroz işitme kaybına neden olabilmektedir. Miringosklerozun önlenmesi bu açıdan önemlidir. Miringoskleroz gelişiminde, orta kulak kavitesinde gelişen hiperoksik durum nedeniyle artan serbest oksijen radikalleri ve mekanik hasarlanmanın asıl neden olabileceği gösterilmiştir. Çalışmamızın amacı antioksidan bir madde olan Epigallokateşin-3-gallat (EGCG)'ın miringosklerozu önlemedeki rolünü araştırmaktır.

Bu çalışmada 18 adet rat rastgele üç gruba ayrıldı. Gruplardaki bütün ratların bilateral kulak zarlarına miringotomi uygulanıp 1. gruba herhangi bir tedavi verilmedi. 2. gruptaki ratlara intraperitoneal olarak serum fizyolojik, 3. gruptaki ratlara ise intraperitoneal olarak EGCG verildi. İşlem sonrasında ratların bullaları çıkarıldı. Ayrıca ratların dekapitasyon sırasında intra kardiyak olarak kanları da alındı. Her bir gruptaki miringoskleroz derecesi önce vizüel sonra histopatolojik olarak değerlendirildi. Alınan kanlarda Malondialdehid (MDA), Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutasyon peroksidaz (GPX) düzeylerine bakıldı.

EGCG verilen grupta miringoskleroz (MS) vizüel ve histopatolojik olarak diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük bulundu ($P < 0,005$). EGCG verilen grupta MDA, SOD, ve CAT düzeyleri arasında diğer gruplara göre anlamlı farklar bulundu ($P < 0,05$). Gruplardaki GPX düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadı ($P > 0,05$).

Sonuç olarak antioksidan bir madde olan EGCG'nin miringotomi uygulanan kulaklarda miringoskleroz gelişimini önlediği ve antioksidan enzimler üzerinde olumlu etkileri olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar sözcükler: Miringoskleroz, antioksidan enzimler, EGCG

ABSTRACT

One of the complications of the ventilation tube insertion in patients with otitis media with effusion is myringosclerosis. The prevention of myringosclerosis is important because it can cause hearing loss. The pathogenesis of myringosclerosis might be due to an increased production of O₂ derived free radicals as an outcome of a hyperoxic condition and mechanical damage in the middle ear cavity. Aim of our study is to evaluate the protective effect of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as an antioxidant on myringosclerosis.

In this study, 18 rats were divided into 3 groups randomly. After myringotomy of all of rats, group 1 was left untreated. Intraperitoneal saline was given to group 2 and intraperitoneal EGCG was given to group 3. After the processing, the bullas of rats were removed. Also intracardiac blood were taken during decapitation. The grade of myringosclerosis in all of the groups was evaluated visually and histopathological. Malondialdehyde (MDA), Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione peroxidase (GPX) levels were looked at blood samples.

The grade of myringosclerosis (MS) was significantly more lower in EGCG group than other groups ($P < 0,005$). MDA, SOD and CAT levels were significantly different in EGCG group than others ($P < 0,005$). GPX levels were not significantly different in all groups ($P > 0,05$).

In conclusion; we showed that EGCG as an antioxidant has a preventive role in the development of myringosclerosis in the experimental animal model after myringotomy and a positive effect on antioxidant enzymes.

Key words: Myringosclerosis, antioxidant enzymes, EGCG

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Miringoskleroz (MS) timpanik membranın belirli alanlarında kollajen tabakasının hiyalinizasyon ve kalsifikasyonu ile karakterize olup beyaz kireç lekeleri şeklinde görülür. Histolojik olarak lamina propria içerisinde kolajen liflerinde artışın yanısıra hiyalin dejenerasyonu ve ekstrasellüler kalsiyum birikimide olmaktadır [1]. Nedenleri arasında ventilasyon tüpü takılması, orta kulak iltihabı, travma, çeşitli kimyasal ajanlar, efüzyonlu otitis media ve immünite olarak gösterilmektedir [2]. Ayrıca Genetik ve lokal metabolik değişikliklerde MS etyolojisinde suçlanmaktadır [3]. MS timpanik membrandaki yara iyileşme sürecinin farklı dönemlerinde ortaya çıkabilen geri dönüşümsüz bir durumdur.

Timpanoskleroz (TS) teriminin tarihsel gelişimine baktığımız zaman ilk olarak Cassebahr timpanosklerozu timpanik membranda kireçli yamalar şeklinde tarif etmiş [4]. Von Trolsch 1873'de ilk kez skleroz terimini eklemiştir [5]. Zollner 1956 yılında timpanoskleroz olarak adlandırmıştır [6]. Bu süreçte sklerotik plaklar çoğunlukla muayene esnasında timpanik membranda görüldüğünden dolayı da miringoskleroz olarak ifade edilmektedir [7]

Son yıllarda yapılan çalışmalar da ventilasyon tüpü takılması veya timpanik membran travması sonrası MS gelişimi ile reaktif oksijen ürünleri arasında ilişki olduğu ortaya konmuştur [8, 9].

Miringoskleroz oluşturularak yapılan bazı deneysel çalışmalarda da antioksidan özelliği olan bazı maddelerin miringoskleroz formasyonu sonucu oluşan sklerotik lezyonları azalttığı bildirilmiştir [1, 10]. Epigallokateşin 3-gallat da antioksidan özellikleri olan bir maddedir [11]. Bu maddenin miringoskleroz oluşturulan ratlarda miringoskleroz üzerine etkisinin ortaya konulması ventilasyon tüpü takılması gibi kulak zarına yönelik girişimsel işlemler sonucu oluşan miringosklerozun önlenmesine katkıda bulunacaktır.

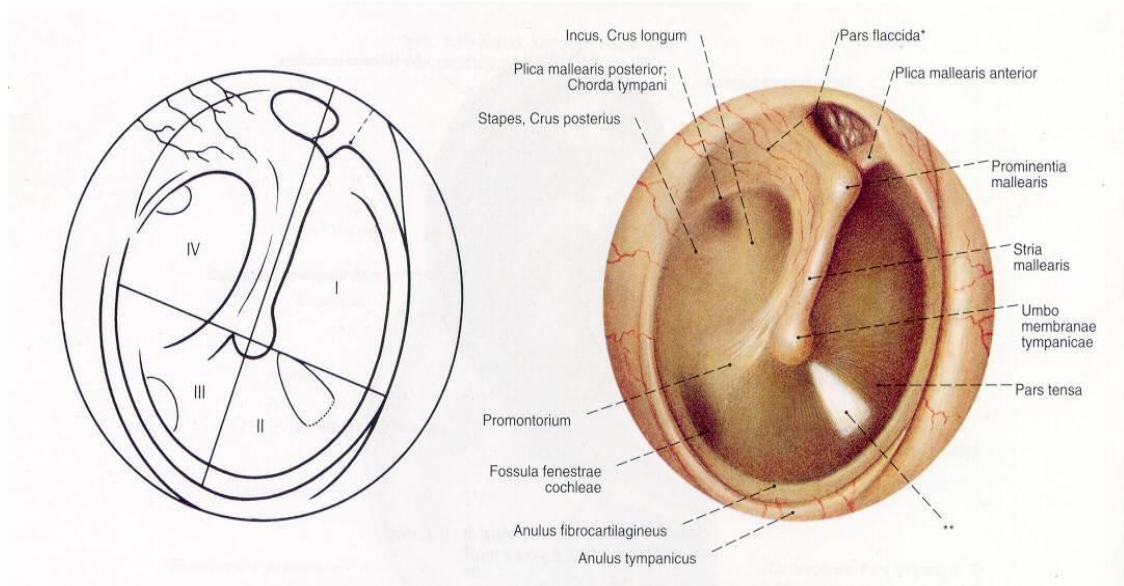
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Anatomik Yapı

2.1.1. Kulak Zarının Yapısı

Timpanik membran dış kulak yolu ile orta kulağı birbirinden ayırır. Timpan zarı erişkinde aurikuladan ortalama 2.5-3 cm uzaklıktadır. Zar horizontal çapı 8-9 mm, vertikal çapı 9-10 mm ve ortalama kalınlığı 0.1 mm dir. Total alanı 66-90 mm², fizyolojik efektif alanı ise 55 mm² dir [12].

Kulak zarı timpanik kemiğin sulkus timpanikus denilen kısmına oturur. Buraya ring yani timpanik halka denilir. Timpanik kemik öne ve arkaya doğru iki uzantı göndererek sulkus timpanikusunu yapar. Fakat bu uzantılar birbirleri ile birleşmez ve halkanın üst ucu açık kalır. Açık kalan bu kısmı skuamöz kemiğin skutum denilen parçası doldurur. Skutumun doldurduğu timpanal kemiğin iki uzantısı arasındaki açıklığa Rivinius çentiği adı verilir. Kulak zarı sulkus timpanikus içerisine annulus fibrosus tarafından sabitlenir. Timpanik kemiğin her iki uzantısının bitim noktalarından malleusun başına doğru iki plika uzanır ve kulak zarını malleusa bağlar. Bunlar plika malleus anterior ve posterior adını alırlar [13].



Şekil-1. Kulak zarının lateralden görünümü [14].

Kulak zarının timpanal kemik içinde kalan kısmına pars tensa denir. Pars tensa gergindir ve ses dalgaları ile titreşen kısım burasıdır. Rivinius çentiğini dolduran kısım ise gevşektir ve bu kısma ise pars flaccida (Shrapnell zarı) adı verilir. Timpanik membranın mediale doğru çökmüş olan en derin noktasına umbo denir ve bu nokta malleus uzun kolunun timpanik membrana tutunduğu kısımdır. Pars tensanın ön alt

tarafında umbodan başlayarak öne ve aşağıya doğru zarın kenarına kadar uzanan üçgen tarzında aydınlık bir alan görülür. Bu alana Politzer üçgeni adı verilir. Manubrium malleinin eksenine tam umbo hizasında bir dik çizilecek olursa, kulak zarının pars tensa kısmı dört sanal parçaya ayrılmış olur. Ön üst, ön alt, arka ön ve arka alttır [13].

Bu bölünmenin kulak zarındaki lezyonları ve bazı girişimleri belirlemek bakımından yararı vardır. Arka üst bölge inkusun inen kolu, stapesle yaptığı eklem ve korda timpaniyi içermesi bakımından tehlikeli kabul edilir ve bu bölgede kulak zarına ilişkin işlemlerden kaçınılır. Arka alt duvar kulak zarı ile orta kulağın medial duvarı (promotoryum) arasındaki mesafenin en dar olduğu yerdir. Yuvarlak pencere burada yer alır. Diğer bölgeler kulak zarına yapılacak işlemler açısından daha emindir.

2.1.1.1. Kulak Zarının Arterleri

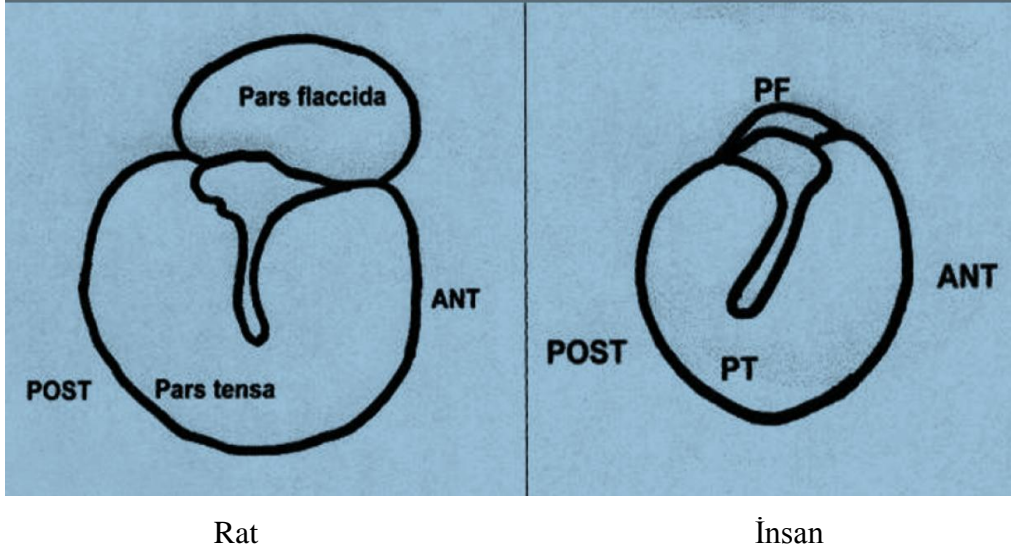
Kulak zarının beslenmesi; lamina propria ile bağlantısı olan epidermal ve mukozal yüzeylerden gelen arterlerle sağlanır. Membranın dış yüzünün kanlanması internal maksiller arterin bir dalı olan derin aurikuler arter, medial yüzünün kanlanması ise posterior aurikuler arter ve timpanik arter ile olur ve venler arterlere eşlik eder [13, 15, 16].

2.1.1.2. Kulak Zarının İnervasyonu

Nervus Vagus' un aurikuler dalı, n. fasialis' in aurikuler dalı, n. trigeminus' un n. mandibularis dalına ait aurikulotemporalis dalı ve N. Glossofaringeus' un timpanik dalı tarafından sağlanır [13, 15, 16].

2.1.1.3. İnsan ve Rat Kulak Zarları Arasındaki Farklar

İnsan ve rat kulak zarları benzer özellik göstermekle birlikte Şekil-2'de görüldüğü gibi farklılıklarında bulunmaktadır [17].

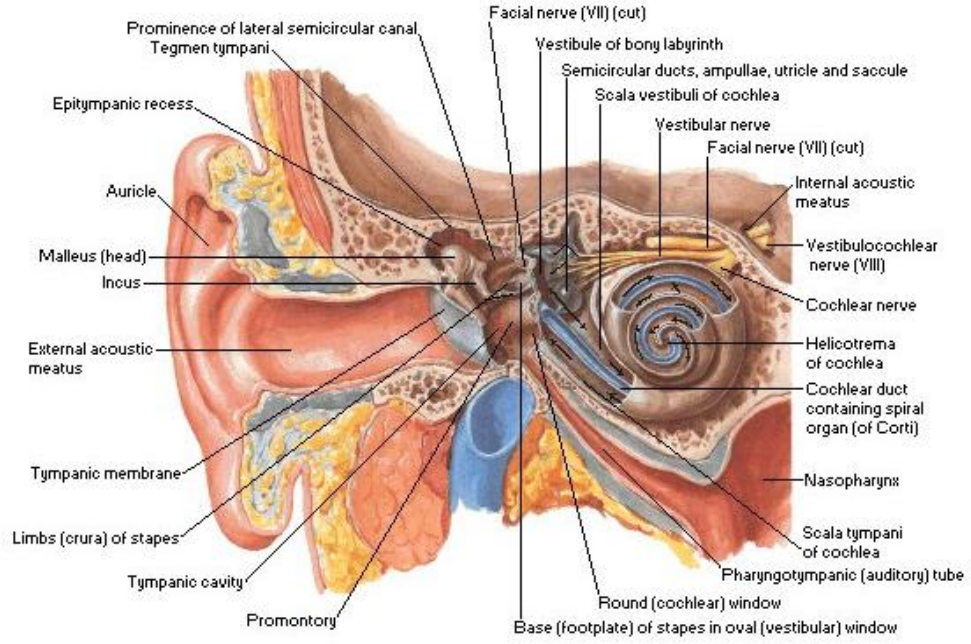


Şekil-2. Rat ve insan kulak zarının karşılaştırmalı şekli (PF: Pars flaksida, PT: Pars tensa, ANT: Anterior, POST: Posterior) [17].

- 1-İnsanlarda pars fleksida pars tensanın %3-6 sı kadarken ratlarda %25-29'u kadardır.
- 2-Malleusun kısa prosesi insanda anterioru işaret etmekte iken ratlarda posterioru işaret etmektedir.
- 3-İnsan timpanik membranının antero-posterior çapı 9-10.2 mm civarında iken, rattaki 2.2-2.4 mm civarındadır.
- 4-İnsanda malleus posterior duvara doğru yönelirken, ratlarda inferior duvara doğru hafifçe eğilmekte [17].

2.1.2. Orta Kulak

Orta kulak, timpan zarı ile iç kulağın kapsülü arasındaki boşluktan, bu boşluğun içindeki ossiküler ve musküler yapılardan ve tuba auditiva (östaki tüpü) ile mastoid hava hücreleri olarak tanımlanan eklerden oluşur. Ses dalgalarının iç kulağa iletilmesinde görev alır. Timpan zarının üst ve alt sınırları timpan boşluğunu epitimpanum (attik), mesotimpanum ve hipotimpanum adındaki bölümlere ayırır [18]. Orta kulak dar ve yüksek bir boşluktur. Ortalama hacmi 0,5 cm³ olarak kabul edilmektedir. Orta kulağın düşey ve ön arka uzunluğu hemen hemen eşit olup yaklaşık 15 mm dir. Ancak bu genişlikler her yerde aynı değildir.



Note: arrows indicate course of sound waves

Schematic frontal section



Şekil-3. Orta kulağın komşulukları [19].

Orta kulağın yüksekliği ön altta karotid kanalının yaptığı tümsek yüzünden azalır. Önde eustachi borusunun ağzında yüksekliği yaklaşık 7 mm iken, arkada aditus hizasında 15 mm'dir. Aynı şekilde, orta kulağın medio lateral yöndeki genişliği de promontoryumun tümsekliği yüzünden altta daha azdır. Tegmen hizasında 7 mm olan genişlik, umbonun çöküntüsü ve promontoryumun çıkıntısı yüzünden altta 1.5-2 mm'ye kadar iner. Bu nedenle alt arka kadrandan yapılacak parasentezlerde promontoryumu yaralama olasılığı artar.

Orta kulak prizma gibi altı yüzey gösterir. Dış ve iç, üst ve alt, ön ve arka. Timpanik kavitenin sınırlarını şu şekilde özetleyebiliriz (Şekil-3).

Tavan : Tegmen timpani adını alır ve orta fossa ile komşudur.

Taban : Bulbus ve vena jugularis ile komşudur.

Arka duvar : Arka kısım mastoid ile ilişkilidir.

Ön duvar : İnternal karotid arterin yaptığı çıkıntı, östaki borusu ve m. tensor timpani bulunur.

İç duvar : Promontoryumun yaptığı çıkıntı ile iç kulakla komşuluk gösterir.

Dış duvar : Yukarıdan aşağıya doğru skutum, kulak zarı, ve hipotimpanum diye kısımlara ayrılır [13].

Orta kulak bosluğunun arteriyel kanlanması a. Aurikularis posteriorun

stilomastoid dalı orta meningeal arterin ramus petrosus ve ramus timpanikus superior dalları, a. maksillaris internanın anterior timpanik dalı, ve a. karotis internanın karotikotimpanik dalları ile sağlanır.

Venöz drenaj pterigoid venöz pleksusa ve superior petröz sinüse olur. Lenfatik drenajı parotid ve retrofaringeal lenf nodlarına olmaktadır.

Orta kulak duyu dallarını timpanik plaksus ile sağlar. Timpanik plaksus 9. kranial sinirin timpanik dalı ve internal karotis arterin sempatik pleksustan gelen sempatik ve parasempatik liflerinden meydana gelmiştir [13, 15].

2.2. Timpanik Membranın Histolojik Yapısı

Pars tensa üç tabakadan oluşur. Dışta DKY derisi, iç yüzde orta kulak mukozası ve bunların arasında da fibröz tabaka vardır. Fibröz tabaka dışta stratum radiale ve içte stratum sirkulare denilen liflerden yapılmıştır. Sirküler tabakada parabolik, semisirküler ve transvers lifler vardır. Fibröz tabaka kapillerlerden fakirdir. Bu yüzden dış etkenlerle kolayca erir. Ayrıca arka üst kısmında bazı kişilerde olmayabilir. Bu yüzden negatif basınca en duyarlı kulak zarı kısmı arka üst kısımdır. Pars tensa pars flaksidadan daha esnek ve gevşek yapıya sahiptir. Pars flaksida bölgesinde fibröz tabaka yoktur. Buna karşılık ince konjunktif bir tabakanın bulunduğu son yıllarda gösterilmiştir. Bu tabakada zengin bir kapiller ağı ve sinirler bulunur [13].

2.3. Perfore Timpanik Membranın İyileşme Mekanizması

Kulak zarında farklı nedenlerle meydana gelen perforasyonların büyük bir kısmı timpanik mebrandaki epitel dokunun proliferasyon ve migrasyon aktivitesine bağlı olarak kendiliğinden iyileşmektedir [20]. Travmatik perforasyon sonrası kulak zarının rejenerasyonu epitel proliferasyonu, epitel göçü, fibroblast proliferasyonu, neo-anjiogenezis ve dokunun yeniden şekillenmesini içeren karmaşık bir biyolojik süreçtir [21, 22]. Timpanik membranın iyileşmesi iki önemli nedenden dolayı vücuttaki diğer doku iyileşmelerinden ayrılır. İlk olarak dıştaki skuamöz epitelin kulak zarının merkezinden annulusa ve dış kulak yoluna doğru sürekli bir migrasyon halinde olması, ikincisi ise perforasyon alanında rejenerasyon gösteren epitele altta destek görevi gören, reperatif hücrelere ve besinlere geçiş sağlayacak önceden oluşmuş bir matriksin olmamasıdır [21, 23, 24]. Perforasyonu takiben artmış proliferasyon ve keratinosit öncü hücrelerin migrasyonu umbo, annulus bölgesi ve malleus boyunca rüptür sınırına doğrudur. İnce epitelyal tabakanın aktivasyonu bazal laminanın genişlemesi için iskelet görevi görmektedir [25]. Timpanik membranda perforasyon oluşumunu takiben fibröz tabakada ödem, epitelde nekroz ve perforasyon kenarlarında eksuda oluşması sayesinde

perforasyon kenarları korunarak dehidratasyon önlenmiş olur [26]. Perforasyon sonrasındaki ilk iki gün içerisinde, arta kalan timpanik membranın dıştaki epitel katında yoğun bir proliferasyon başlamaktadır [27]. Rat timpanik membranında yapılan bir çalışmaya göre erken dönemdeki epitelyal proliferasyonun perforasyon kenarlarında değil de perforasyon alanından uzak olan anulus ve manubrium mallei civarında başladığı gösterilmiştir [28]. Perforasyon alanının uzağında proliferasyon alan epitelyum hücreleri, perforasyon alanında biriken keratinin kılavuzluğunda perforasyon merkezine doğru ilerleyerek perforasyonu kapatırlar ve timpanik kaviteye ait olan epitel tabakası yavaş yavaş proliferasyon alanına doğru ilerleyerek perforasyonun kapanma sürecinde minimal öneme sahiptir [20, 21, 28]. Kapanmayla birlikte oluşan fibröz tabakanın yeniden şekillenmesi sonucunda perforasyon alanında daha ince bir zar yapısı oluşurken perforasyon alanından uzak olan sağlam alanlarda ise timpanik membran kalınlığının artmış olduğu görülmektedir. İnflamasyondan sonra oluşan fibroblastik aktivasyon ve kollajen sentezi, bu alanlarda timpanik membran kalınlığının artmasına neden olmaktadır [29, 30]. Kalınlaşmış lamina propria içinde sağlam timpanik membranın pars tensasında ağırlıklı olarak bulunan tip II kollajen yerine tip I ve III kollajen birikimi vardır [31, 32]. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalara göre epidermal büyüme faktörü (EGF) yada bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi ajanların lokal olarak uygulanmalarının akut timpanik membran perforasyonlarının kapanma sürecini hızlandırdığı bildirilmiştir [20, 22, 33].

2.4. Miringoskleroz Oluşumu

Miringoskleroz timpanik membranın belirli alanlarında kollajen tabakasının hiyalinizasyon ve kalsifikasyonu ile karakterize olup beyaz kireç lekeleri şeklinde görülür. Histolojik olarak lamina propria içerisinde kollajen liflerinde artışın yanısıra hiyalin dejenerasyonu ve ekstrasellüler kalsiyum birikimide olmaktadır [1]. Nedenleri arasında ventilasyon tüpü takılması, orta kulak iltihabı, travma, çeşitli kimyasal ajanlar, efüzyonlu otitis media ve immünite olarak gösterilmektedir [2]. Ayrıca Genetik ve lokal metabolik değişikliklerde MS etyolojisinde suçlanmaktadır [3]. MS timpanik membrandaki yara iyileşme sürecinin farklı dönemlerinde ortaya çıkabilen geri dönüşümsüz bir durumdur.

Timpanoskleroz teriminin tarihsel gelişimine baktığımız zaman ilk olarak Cassebahn timpanosklerozu timpanik membranda kireçli yamalar şeklinde tarif etmiş [4]. Von Trolsch 1873 de ilk kez skleroz terimini eklemiştir [5]. Zollner 1956 yılında timpanoskleroz olarak adlandırmıştır [6]. Bu süreçte sklerotik plaklar çoğunlukla

muayene esnasında timpanik membranda görüldüğünden dolayı da miringoskleroz olarak ifade edilmektedir [7].

Mattsson C ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre, perforasyon sonrası dokuzuncu saatten itibaren miringosklerozun görülmeye başladığı gösterilmiştir ve timpanik mebranın perforasyonundan sonra başlayan inflamatuvar sürecin dokuzuncu saat gibi erken döneminde gözlenen major histolojik bulgu, kollajen tabakadaki yoğun makrofaj infiltrasyonu olmuştur. Bundan dolayı artmış makrofaj infiltrasyonu ile miringoskleroz gelişimi arasında yakın ilişki olduğu öngörülmektedir [34].

Schiff ve ark. orta kulakta inflamatuvar reaksiyona bağlı lokal antikorların kompleman sistemini aktive ettiği immünolojik teoriyi öne sürerlerken [35], başka bir çalışma da ise fibröz hiperplazi ve timpanik membranda ventilasyon tüp varlığında zarın hareketinin engellenmesine bağlı olarak kalsifikasyon gelişebileceğini bildirmişlerdir [36]. Kulak zarına ventilasyon tüpünün yerleştirilmesi sırasında orta kulaktaki efüzyonun aspire edilmesi ve intratimpanik kanamanın da timpanoskleroz oluşumu için predispozan faktör olabileceği öngörülmüştür [37].

MS nin kesin etyolojisi ve patolojisi henüz bilinmemektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, MS oluşumunda ana nedensel faktörlerin oksijenden türetilmiş serbest radikaller ve mekanik hasar olabileceğini göstermiştir [38].

Timpanik membrana ventilasyon tüpü takılması dışardaki havanın orta kulak kavitesine girişine izin verir ve bu relatif bir hiperoksik durum oluşturur [39]. Bu relatif hiperoksi, oksijenden kaynaklanan serbest radikallerin üretiminde artışa ve bunun sonucu olarakta sklerotik plakların gelişimiyle ilgili sürecin başlamasında ilişkili olabilir [40].

Ayrıca hayvanlar üzerinde yapılan daha sonraki çalışmalar farklı antioksidanların miringosklerozu önleyici etkiye sahip olduğunu göstermiştir [1, 10].

2.5. Radikal Kavramı Ve Oksijen Radikalleri

Atom yapısı, bir çekirdek ve çevresinde bulunan değişik elektronlardan oluşmaktadır. Enerji düzeylerine göre belirli bir düzende yerleşen elektronlar, orbital adı verilen yörüngelerde hareket etmektedir. Her orbitalde yerleşik iki elektron, birbirine zıt yönde kendi eksenini etrafında dönmektedir. Buna uygun olarak her bir orbitale önce birer tane aynı yönde dönen elektron yerleşmekte ve atom numarasına göre sayıları artan elektronlar tekrar aynı sıra ile ters yönde dönecek şekilde orbitale yerleşmektedir.

Atom numarası 8 olan oksijen atomunun 8 elektronu bulunmaktadır. Oksijen molekülündeki aynı yönde dönen iki elektrona sahip 2p son orbitali önem taşımaktadır. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron bir orbitalden diğerine geçtiğinde veya farklı orbitallerde farklı yönde döndüğünde singlet oksijen oluşmaktadır. Orbitallerden birine veya ikisine ters dönüşlü bir veya ters dönüşlü iki elektron yerleştirilmesi ile radikal elde edilmektedir. Doğal oksijen molekülünden değişik sayıda oksidan molekül meydana gelebilmektedir. Serbest radikal, oksidan molekül veya en doğru adlandırma ile reaktif oksijen türleri, atomik veya moleküler yapılarında eşlenmemiş tek elektron içeren ve bu nedenle reaktif özellik taşıyan moleküllerdir (Tablo-1) [41, 42].

Tablo-1. Reaktif oksijen ve azot partikülleri [42].

Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	
Radikaller	Nonradikaller
Süperoksit, $O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Hidroksil, OH^{\cdot}	Hipokloröz Asit, $HOCl$
	Hipobromöz Asit, $HOBr$
Peroksil, RO_2^{\cdot}	Ozon, O_3
Alkoksil, RO^{\cdot}	Singlet Oksijen, $\Delta g O_2$
Hidroperoksil, HO_2^{\cdot}	
Reaktif Azot Türleri (RNS)	
Radikaller	Nonradikaller
Nitrik oksit, NO^{\cdot}	Nitröz asit, HNO_2
Azot dioksit, NO_2^{\cdot}	Nitrozil katyonu, NO^+
	Nitroksil anyonu, NO^-
	Diazot tetroksit, N_2O_4
	Diazot trioksit, N_2O_3
	Peroksi nitrit, $ONOO^-$
	Peroksi nitröz asit, $ONOOH$
	Nitronyum katyonu, NO_2^+
	Alkil peroksinitritler, $ROONO$

2.5.1. Serbest Radikallerin Oluşumu

Serbest radikaller başlıca üç şekilde oluşabilmektedir;

2.5.1.1. Kovalent bağın homolitik ayrılması

Bir molekülü oluşturan kovalent bağın homolitik ayrılması sonucu eşlenmiş elektronlardan herbirinin ayrı parçada kalması ile serbest radikaller meydana gelmektedir.

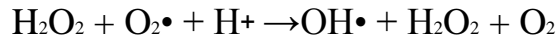
2.5.1.2. Bir molekülün elektron kaybetmesi

Molekülün yapısındaki atomlardan birisinden elektron uzaklaştırılması sonucu oluşmaktadır.

2.5.1.3. Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi

Bir molekül yapısına elektron eklenmesi sonucu reaktif özellik taşıyan yapılar oluşmaktadır. Negatif yüklü elektron sayısı çekirdekdeki pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmayan moleküller oldukları için dayanıklı olmayan serbest radikaller, elektron konfigürasyonlarını pozitif yükle dengelemeleri gerektiğinden çok reaktifirler. Tek elektronunu bir başka moleküle verebilen bu radikaller, bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilmektedir. Sonuçta radikal olmayan bir yapı elektron vererek radikal şekline dönüşebilmektedir.

En reaktif ve toksik etkili radikal olan hidroksil radikali (OH•) Haber-Weiss tepkimesi ile oluşmaktadır (Şekil-4) [41].



Şekil-4. Haber-Weiss tepkimesi

2.5.2. Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Kaynakları

2.5.2.1. Elektron Transport Zinciri

Normal koşullarda mitokondri, sitokrom oksidaz sistemi ile oksijeni suya indirgeyerek detoksifiye etmektedir. Elektron transport sisteminde yer alan pek çok bileşik (NAD, FAD, Koenzim Q gibi) oksijen ile tepkimeye girerek $\text{O}_2\cdot$ salınımına neden olmaktadır. Bu tek değerli oksijen kaçağı olarak tanımlanmaktadır. Bu kaçağa neden olan faktörler bilinmemektedir. Normal koşullarda bu kaçak hücrenin savunma sistemleri ile yok edilebilmektedir. Ancak oksidan stres durumunda savunma sistemleri yetersiz kalmakta ve mitokondride hasar oluşmaktadır. Bu hasar sonucu hücrenin enerji sisteminin etkilenmesi ile ATP kullanımındaki artışa ve ATP sentezindeki azalmaya bağlı olarak hücrede ATP düzeyi hızla düşmektedir. Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenazın iki SH grubunu kaybetmesi sonucu NAD bağlanamadığı veya ATP sentetaz aktivitesi inhibe olduğu için ATP sentezi azalmaktadır [41].

2.5.2.2. Enzimatik Tepkimeler

Oksijen içeren tepkimeleri katalizleyen enzimler oksidazlar veya oksijenazlar olarak sınıflandırılmaktadır. Elektronları oksijene aktaran oksidazlar oksijenin su veya hidrojen perokside (H_2O_2) indirgenmesini sağlamaktadır. Oksijenazlar oksijenin bir substratın yapısına katılmasını gerçekleştirmektedirler. Bu gruptaki enzimlerin

katalizlediği tepkimelerde serbest radikaller oluşabilmektedir. Vücutta enzimatik tepkimelerde endojen olarak oksijen metabolitleri meydana gelebilmektedir.

2.5.2.3. Enzimatik Olmayan Tepkimeler

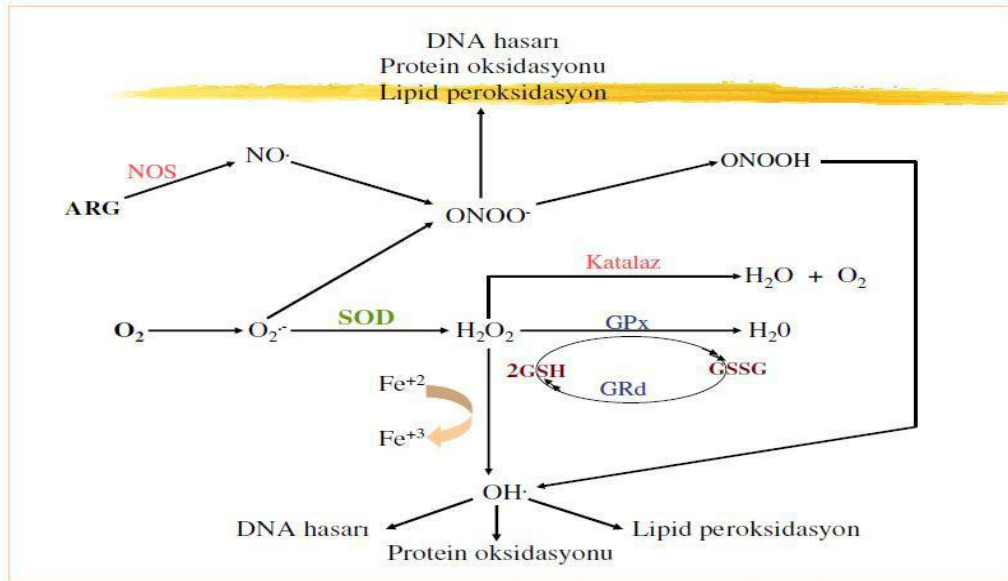
Otooksidasyon tepkimeleri sonucu enzimatik olmayan kaynaklardan reaktif oksijen metabolitleri oluşmaktadır

2.5.2.4. Dış Etmenler

Radyasyon, sigara, alkol, hava kirliliği gibi çeşitli dış etkenler ile reaktif oksijen metabolitleri oluşabilmektedir.

2.5.3. Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Biyolojik Etkileri ve Hücre Hasarı

Serbest radikaller hücre sel yapıları etkileyerek hücre hasarına yol açmaktadır. Protein yapısında bulunan özellikle prolin, histidin, arginin, sistein, ve metiyonin amino asitleri radikal hasarına açıktır. Bu amino asitlerin oksidasyonu proteinlerin parçalanmasına, çapraz bağ oluşumuna, agregasyona ve proteinlerin proteolitik parçalanmaya yatkın hale gelmesine neden olmaktadır [41].



Şekil-5. Serbest radikallerin hücre sel kaynakları ve şematik olarak hasarı [43].

Memeli hücre membranları peroksidatif hasara karşı çok duyarlı olan büyük miktarda çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içermektedir. Bu yağ asitlerinin peroksidasyonu hücre sel hasarın en önemli nedenlerinden biridir. Yağ asitlerinin peroksidasyonu zincir tepkimeleri şeklinde sürmektedir (Şekil-5). Yağ asidi ile birleşen radikal, bir dizi tepkimeyi başlatmaktadır. Lipid peroksidasyonu ve kükürt içeren proteinlerin oksidasyonu sonucu membran geçirgenliği ve kırılabilirliğinin artması ile membran enzimlerinin aktivitesi azalmakta ve hücreye kalsiyum girişi artmaktadır.

Hücre içi serbest kalsiyum artışına bağlı olarak artan fosfolipaz aktivitesi, fosfolipid kaybının artmasına, membran geçirgenliğinde değişiklik ve potansiyel kaybına bağlı toksik etkide artışa, proteaz aktivasyonu ile proteolitik etkinin şiddetlenmesine, katabolik enzimlerin aktivitesinde artışa ve endonükleaz aktivitesi ile DNA kırılmalarına yol açmaktadır.

Herhangi bir nedenle oluşan serbest radikaller ve özellikle malondialdehid, hücre çekirdeğinde başlıca DNA ile tepkimeye girmektedir. Nükleik asit yapısındaki baz değişimleri veya DNA zincir kopması sonucu kromozomal yapıda değişiklikler oluşturarak sitotoksositeye neden olmaktadır. Sonuçta mutajenik ve karsinojenik etkiler görülmektedir. Serbest radikallerin hücredeki bu etkileri sonucu pek çok hastalığın oluşabileceği düşünülmektedir [41].

2.5.4. Antioksidan Savunma

Hücrelerde oksidatif hasarı önleyen, yok eden veya kısmen azaltan bazı mekanizmalar bulunmaktadır. Direkt etki ile oksidanları inaktif hale getiren maddelere antioksidanlar adı verilmektedir.

Tüm antioksidanlar etkilerini başlıca dört farklı şekilde gerçekleştirmektedirler.

1-Enzimler, oksidanları tutup daha zayıf moleküle dönüştürerek

2-Vitaminler ve flavonoidler gibi bileşikler, oksidanlara bir hidrojen katarak

3-Oksidanların oluşturduğu hasarı onararak

4-Ağır metaller, hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engellemektedirler.

Antioksidan savunma sistemleri enzimatik ve enzimatik olmayan iki kategoride incelenebilir (Tablo-2)[44].

Tablo-2 . Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar [44].

Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
	Doğal	Sentetik
Süperoksit dismutaz (SOD)	Vitamin C	Bütillenmiş hidroksianisol (BHA)
Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GPx)	α -tokoferol	Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)
Glutatyon-S-transferaz (GST)	Polifenolik bileşikler	Gallik asit türevleri
Katalaz	Karotenoidler	Tersiyer bütihidrokinon (TBHQ)
Glutatyon redüktaz (GR)		Nordihidroguareyetik asit (NDGA)

2.5.4.1. Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri

Oksijenin hidrojen peroksida dismutasyonunu süperoksid dismutaz (SOD), hidrojen peroksidin dismutasyonunu ise CAT katalizlemektedir. Glutasyon peroksidaz ise hidrojen peroksid ve lipid peroksidlerini indirgemektedir. Yükseltgenmiş glutasyonun (GSSG), indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü sağlayan glutasyon redüktaz, indirek yolla antioksidan etki göstermektedir. Enzimatik savunma sistemleri arasında NADH peroksidaz ve oksidaz ile Sitokrom C oksidaz da yer almaktadır [41].

2.5.4.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Oksijeni metabolize eden bütün canlılarda bulunan SOD, süperoksiti hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu katalizleyen bir metalloenzimdir.

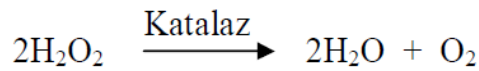


Şekil-6. Süperoksid radikalinin hidrojen peroksida dönüşümü.

Bu güne kadar dört farklı şekli bulunmuştur [41].

2.5.4.1.2. Katalaz (CAT)

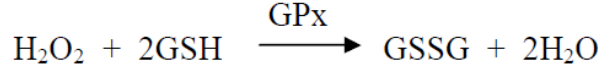
Yapısal olarak bir hemoprotein olan CAT'ın molekül kütlelerinin 248 kDa olduğu ve kovalent olmayan bağ ile bağlı protoporfirin 9 Fe (hem) grubu içerdiği ortaya konmuştur. Kan, kemik iliği, müköz membranlar, karaciğer ve böbrekte yüksek miktarlarda bulunmaktadır. CAT hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalar. Enzimler arasında en yüksek katalitik dönüşüm hızına sahip olduğu bilinen CAT'ın aktivitesi için demir gerekmektedir [41].



Şekil-7. Hidrojen peroksidin suya dönüşümü.

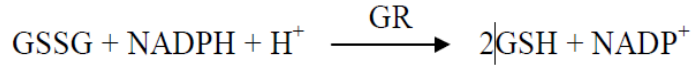
2.5.4.1.3. Glutasyon redüktaz (GR) ve Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz, glutasyon ile hidrojen peroksit veya lipid peroksitlerinin indirgenmesinde görev almaktadır.



Şekil-8. Glutasyon peroksidazın hidrojen peroksidi suya indirgemesi.

Glutasyon redüktaz ise glutatyonda oluşan disülfid bağının tekrar sülfidril yapısına indirgenmesinde görev yapmaktadır.



Şekil-9. Glutasyon redüktazın glutasyonu indirgeme tepkimesi.

Glutamik asid, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptid olan glutasyon, indirgenmiş (GSH) ve yükseltgenmiş (GSSG) şeklinde bulunmaktadır. Hücrenin yükseltgenme indirgenme dengesini koruyan önemli bir indirgen ve antioksidan olan glutasyon, hücreleri endojen ve eksojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır. Proteinlerin –SH gruplarının korunması ve amino asidlerin hücre içine taşınmasında rol oynamaktadır. Glutasyon (GSH) selenyum içeren glutasyon peroksidaz ile yükseltgenmektedir (GSSG).

GPx, aşırı hidrojen peroksit varlığında glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG, glutasyon disülfür) oksidasyonunu katalize ederken, hidrojen peroksiti de suya dönüştürür [45].

2.5.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri

2.5.4.2.1 Metal İyonlarının Etkisizleştirilmesini Sağlayan Antioksidanlar:

Bu grupta metal iyonlarını bağlayarak elektron transferini engelleyen transferrin, laktoferrin, ferritin, seruloplazmin, albümin, hemoglobin, heptoglobulin ve hemopeksin gibi bileşikler bulunmaktadır.

2.5.4.2.2. İn Vivo Sentezlenebilen Düşük Moleküler Ağırlıklı Antioksidanlar:

Cinsiyet hormonları, melanin, melatonin, lipoik asid, bilirubin, ürik asid ve ubikinon (koenzim Q) bu grupta yer almaktadır.

2.5.4.2.3. Diyetle Alınan Düşük Moleküler Ağırlıklı Antioksidanlar:

E vitamini ve analogları lipid peroksidasyon zincirini kırmaktadır. $\text{O}_2\cdot^-$ ve $\text{OH}\cdot$ tutucusu olan C vitamini, E vitaminini rejenere etmektedir. Hücre büyümesi,

farklılaşması ve görme için esansiyel bir vitamin olan A vitamini peroksiller üzerine doğrudan etkili olmaktadır [41].

2.5.4.2.4. Karotenoidler ve Fenolik Yapılar:

Karotenoidler A vitamini öncülü olup yağda çözünmektedir. Doğada birçok bitki, alg ve küçük organizmalarda bulunurlar. 600'den fazla karotenoid çeşidinin var olduğu bilinmektedir. Epikateşin (yeşil ve siyah çay), kateşin (kırmızı şarap), kamferol (brokoli, greyfurt ve siyah çay), kuersetin (soğan, brokoli, çilek), antosiyaninler (renkli meyveler, kırmızı şarap, çilek, vişne), kafeik asid (zeytin ve kahve), gibi bazı bitkisel fenolik maddeler diyetle bulunmaktadır [46]. Polifenollerin serbest radikal süpürücü aktivite için ideal kimyasal yapıya sahip oldukları ve derişim düzeyinde in vitro olarak α -tokoferol ve vitamin C'den daha etkin antioksidan özellik gösterdikleri ispatlanmıştır [47].

2.6. Malondialdehid (MDA)

Lipid peroksidasyon (LPO) reaksiyonları, genel olarak serbest radikal kaynaklı zincir reaksiyonları olarak bilinir ve serbest radikal poliansature yağ asitleri (PUFA) olarak temsil edilen çok sayıdaki substratın oksidasyonunu indükleyebilir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile Malondialdehid (MDA) oluşur. MDA düzeyi lipid peroksidasyonunun yaygınlığı ile korelasyon gösterir [48]. MDA membran bileşenleri ile çapraz bağlar yapar, polimerizasyona neden olur [49]. Bu değişiklikler membran fonksiyonunda bozulmaya, membran akışkanlığında azalmaya, membrana bağlı mediatörlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna ve kalsiyum gibi iyonlar için membran permeabilitesinin artışına yol açar [50]. MDA, kimyasal olarak aktif bir moleküldür, çevre hücre ve dokulara kolayca difüze olarak moleküler düzeyde, özellikle proteinler üzerinde zararlı etkiler gösterebilir. MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir [51].

Lipid peroksidasyonu ürünleri serbest radikal reaksiyonları sonucu ve/veya araşidonik asit metabolizmasında oluşurlar. Lipoksijenaz aktivasyonu ve prostaglandin I₂ (prostasiklin) inhibisyonuyla kan damarlarında, trombositlerde prostasiklin/tromboksan yolunda dengesizliğe yol açarlar. Böylece lökotrienleri stimüle ederek ağırlı inflamatuvar reaksiyonları başlatabilirler [49].

Sağlıklı dokularda çok düşük düzeylerde olan lipid peroksidasyonunun artışı serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu doku hasarının göstergesi olarak kullanılabilir. Lipid peroksidasyonu yıkım ürünlerinden birisi de malondialdehiddir

(MDA). Serumdaki MDA düzeyinin ölçümü in vivo serbest oksijen radikalleri aracılı doku hasarının bir göstergesi olarak kullanılabilir [52].

Malondialdehid çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonunun en önemli ve en çok çalışılan bir üründür. 1960'larda in vivo ve in vitro olarak oksidatif stres seviyesini ölçmede bu molekülden yararlanmak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir [53].

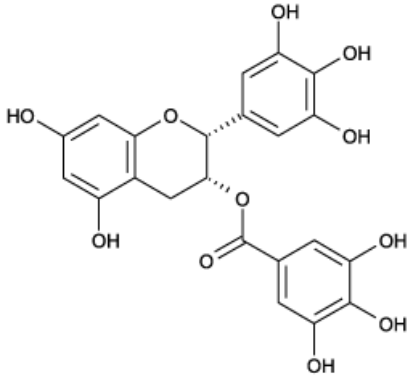
2.7. Epigallokateşin-3-Gallate (EGCG)

Epigallokateşin-3-Gallate, yeşil çayın majör polifenolü olup potent antioksidan özelliği mevcuttur [11]. EGCG yeşil çayın kuru ağırlığının üçte birini oluşturmaktadır ve yeşil çayın yararlı etkilerinden sorumludur[54, 55]. Yeşil çayın potent antioksidatif etkinliği diğer kateşinlerde bulunmayan kimyasal yapılarından dolayı Epikateşin gallat (ECG) ve Epigallocatechin-3-gallat (EGCG)' a aittir [56].

Epigallokateşin-3-Gallate yeşil çaydaki predominant kateşin olup güçlü bir antioksidan olarak radikal temizleyici, redüksiyon ve metal şelasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir [57]. EGCG nin lipozom oksidasyonu, DNA kırılması ve LDL oksidasyonuna karşı inhibitör etkisini de içeren biyolojik sistemlerdeki anti-oksidan aktivitesi in-vitro ve in-vivo birçok çalışmada rapor edilmiştir [58].

Epigallokateşin-3-Gallate'nin protektif özelliğinin hücresel mekanizması henüz net olmamakla birlikte nitrik oksit ve oksidatif stres yollarının etkisi olduğu düşünülmektedir. EGCG çeşitli mekanizmalarla oksidatif strese karşı kısa ve uzun dönem koruma sağlamaktadır [59].

Epigallokateşin-3-Gallate, doğadaki diğer fenolik antioksidanların çoğu gibi suda çözünmekte, bununla birlikte lipofilik sistemlerdeki etkisini lipofilik tabakada kısmi olarak çözünerek göstermektedir. Bu zayıf lipofilisite, düşük in vivo selüler absorpsiyonu neden olmaktadır; yapısal modifikasyonu ile lipofilisite arttırılabilir ve hücre içine girişi kolaylaşabilir. Bu amaçla suda çözünen EGCG uzun zincirli sature ve poliansature yağ asitleri ve üç ester derivesi (EGCG tetrasiterat, EGCG tetraeikosapenta onat, EGCG tetradokosaheksaenoat) ile esterifiye edilmiştir [60].



Şekil-10. Epigallocatechin-3-gallate'nin (EGCG) moleküler yapısı.

Epigallokateşin-3-Gallate'nin anti-inflamatuar, anti-artritik ve kanser kemoprevensiyonu gibi birçok biyolojik etkileri bulunmaktadır. Bu etkiler birçok deneysel modelde kullanılmıştır [61, 62].

Epigallokateşin-3-Gallate'nin lipid peroksidasyonunu önleyerek, tip 1 diyabet riskini azaltabileceği ve hipoglisemik ve hipolipidemik etkileri olduğu gösterilmiştir [54, 63, 64]. Yeşil çayın ve etkili içeriklerinin Alzheimer ve Parkinson hastalığının insidansını azalttığı düşünülmektedir. Yeşil çayın ana kateşin polifenol içeriği olan EGCG oksidatif hasar ve nöral dejenerasyona karşı nöral koruyucu ve kurtarıcı etkileri olduğu gösterilmiştir [65]. EGCG'nin deneysel çalışmalarda kardiyoprotektif etkinliği saptanmıştır [66]. Bu kardiyoprotektif etkinlik, antioksidatif, damar koruyucu, anti-hipertansif, anti-inflamatuar, anti-proliferatif, anti-trombojenik ve lipid düşürücü etkilerini içermektedir [67].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi (KSÜTF) Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu onayı (05.04.2012 tarih ve 94 sayılı yazı) alındıktan sonra KSÜTF Hayvan Laboratuvarında yetiştirilmiş olan ve ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen Wistar albino cinsi erkek ratlar çalışmaya alındı.

Çalışmada dış kulak yolu ve kulak zarları sağlam, ağırlıkları 250–300 gram arasında değişen toplam 18 adet Wistar albino cinsi ratlar kullanıldı. Ratlar ışık alan bir odada, 25 °C sıcaklıkta, serbest yem ve su aldıkları bir ortamda barındırıldı.

Öncelikle anestezi için ratlara intramusküler olarak ketamin hidroklorid (40 mg/kg) ve xylazine (5 mg/kg) yapılarak otomikroskop altında bilateral kulak zarlarına bakılıp, her iki kulak zarları normal olan 18 adet rat çalışmaya dahil edildi. Hayvanlar randomize olarak her bir grupta 6 rat olacak şekilde 3 gruba ayrıldı.

3.1. Miringotomi:

Ratlara anestezi için intramusküler olarak ketamin hidroklorid (40 mg/kg) ve xylazine (5 mg/kg) yapıldıktan sonra otomikroskopik görüş altında, kulak spekulumu ve steril pik kullanılarak her iki timpanik membranın arka üst kadrana 1 mm çapında standart miringotomi yapıldı.



Şekil-11. Miringotomi yapılma aşaması.

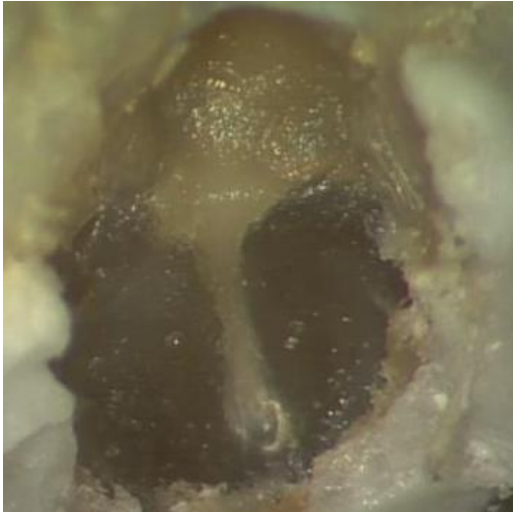
3.2. Çalışma grupları:

3.2.1. Birinci Grup = Miringotomi (M): Hayvanlar anestezi altına alındıktan sonra bilateral timpanik membranlarının arka üst kadranlarında otomikroskop altında parasentez bıçağı ile perforasyon oluşturulup herhangi bir tedavi verilmedi.

3.2.2. İkinci Grup= Miringotomi + Serum Fizyolojik(SF) (M+SF) : Sıçanların bilateral timpanik membranlarının arka üst kadranlarında otomikroskop altında parasentez bıçağı ile perforasyon oluşturulup 10 gün boyunca intraperitoneal olarak günde bir kez 10mg/kg serum fizyolojik verildi.

3.2.3. Üçüncü Grup= Miringotomi + EGCG (M+EGCG): Bilateral kulak zarlarında perforasyon oluşturulan hayvanlara 10 gün boyunca intraperitoneal olarak günde bir kez 10 mg/kg epigallocateşin-3-gallat verildi.

Bu işlemlerden 20 gün sonra sıçanlara tekrar anestezi verilip otomikroskop altında miringosklerozun derecesi vizüel olarak 4 gruba ayrılarak değerlendirildi. Sonrasında hayvanlara intraperitoneal olarak tiyopental sodyum verilip giyotin cihazıyla dekapitasyon yapıldıktan sonra otomikroskop altında sıçanların bullaları çıkarıldı.



Şekil-12. Çıkarılan rat bullası.

3.3. Kanların Alınım CAT, SOD, MDA ve GPx Düzeylerinin Çalışılması:

Hayvanlardan ötanazi sırasında intrakardiyak olarak kanları alındı. Alınan kan örnekleri 4°C de 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edildikten sonra plazmaları ayrıldı. Plazma, lipid peroksidasyon ölçümü için kullanıldı. Eritrositler 3 ml soğuk salin solüsyonu ile 4 kez yıkanıp, her yıkama sonrası 10 dakika 3000 rpm de santrifüj edildi. Bu eritrosit süspansiyonu antioksidan enzim aktivitesi ölçümünde kullanıldı.

CAT aktivitesi 230 nm' de H₂O₂' nin ortadan kalkmasıyla spektrofotometrik olarak ölçüldü [68].

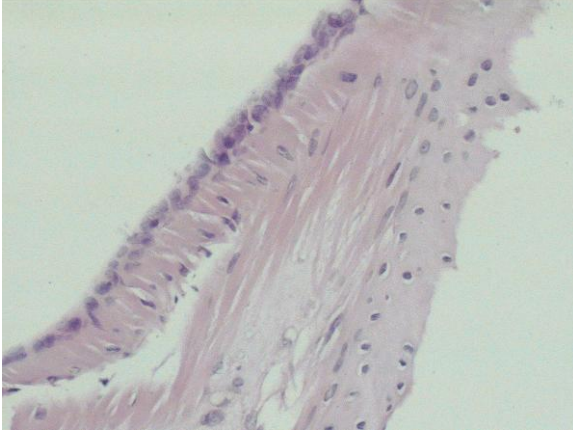
Süperoksid dismutaz aktivitesi Fridovich' in tarif ettiği üzere değerlendirildi. Bu metodla ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak superoksit radikalleri elde edilir. SOD aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyon derecesine göre ölçülmüştür [69].

Plazma lipid peroksidasyon (toplam MDA) konsantrasyonu küçük modifikasyonlar ile Ohkawa yöntemi ile tespit edilmiştir. MDA sonuçları (nmol / ml) olarak ifade edilmiştir [70].

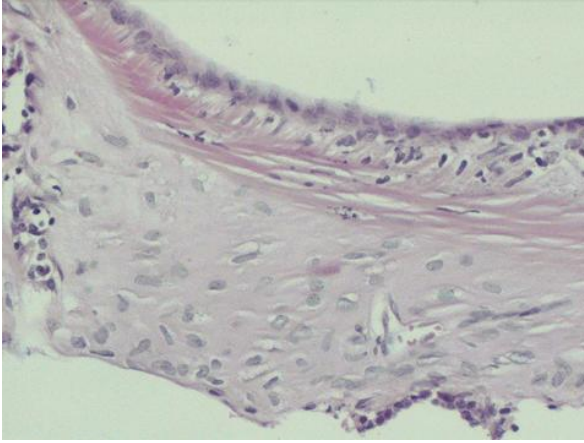
Gulutasyon peroksidaz aktivite ölçümü için Beutler metodu kullanılmıştır. GSH-Px, H₂O₂ vasıtasıyla redükte glutatyon (GSH)'un okside glutatyon (GSSG)'a oksidasyonunu katalize eder. H₂O₂ t-bütillidroperoksinin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımıyla GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın NADP'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkınının 340 nm'de spektrofotometrik olarak okunmasıyla tayin edilmiştir [71].

3.4. Histopatolojik İnceleme:

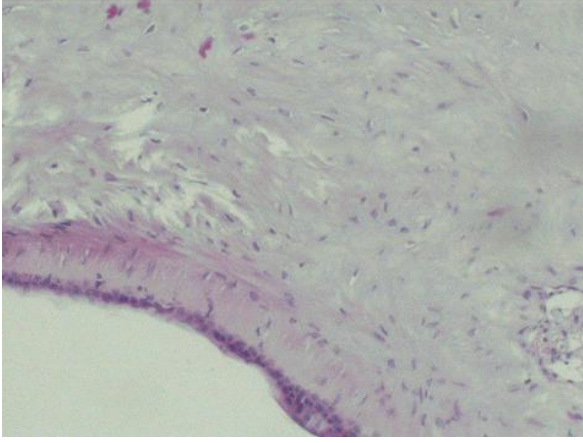
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalında aynı patolog tarafından hangi grubun hangi maddeyi aldığından habersiz olarak çıkarılan bullalar %10 luk formaldehit içerisinde fikse edilip daha sonra %7 nitrik asit solüsyonuna alınıp dekalsifiye edildi. Çıkarılan bullalardan 4 mikron kalınlığında hematoksilen eozin ile boyalı kesitler alındı. Timpanik mebranların lamina proprialarındaki artmış fibroblastik proliferasyonun yoğunluğu ve sklerozisi semikantitatif olarak; miringoskleroz yok, hafif(lamina propriada birkaç lezyon), orta (lamina propriada tek yada birbiri ile birleşen lezyon), şiddetli (lamina propriada geniş ve birleşen lezyonlar) şeklinde dört gruba ayrılarak ışık mikroskobu altında değerlendirildi.



Şekil-13. M+EGCG grubundan örnek kesit. Timpanik membranda fibroblastik proliferasyonun ve sklerotik değişimlerin olmadığı, timpanik membranın M+SF ve M gruplarına göre daha ince olduğu görülmektedir (H&E, $\times 20$) .



Şekil-14. M+SF grubundan örnek kesit. Timpanik membranda fibroblastik proliferasyonun ve sklerotik değişimlerin hafif derecede olduğu, nispeten ince timpanik membran görülmektedir (H&E, $\times 10$) .



Şekil-15. M grubundan örnek kesit. Artmış timpanik membran kalınlığı dikkat çekiyor. Lamina propria, yoğun hiyalinizasyon ve daha az sayıda fibroblastla birlikte kalınlaşma göstermektedir (H&E, $\times 10$) .

3.5. İstatistiksel analiz:

Otomikroskopik miringoskleroz ve lamina propriada inflamasyon 0 ile 3 arasında skorlandı. Gruplar arasındaki farklılığı test etmek için SPSS programında Anova ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kullanılan tüm analizlerde $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Otomikroskopik Değerlendirme:

Tablo-3. Gruplardaki her bir kulağın otomikroskopik miringoskleroz skoru

Kulaklar	Gruplardaki		
	otomikroskopik	miringoskleroz	skorları
	M	M+SF	M+EGCG
1	3	1	0
2	2	1	1
3	1	3	0
4	2	2	0
5	2	3	1
6	3	2	2
7	1	2	1
8	2	3	1
9	3	2	1
10	2	2	2
11	2	2	0
12	1	3	0
Toplam	24	26	9

(M:miringotomi, MS:miringoskleroz, SF: serum fizyolojik,

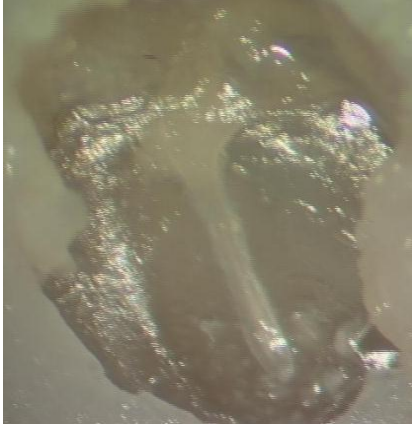
EGCG: Epigallo kateşin 3- gallat)

Otomikroskopik olarak miringoskleroz, istatistiksel analiz yapabilmek için 0'dan 3'e kadar 0:yok, 1:hafif, 2:orta, 3: şiddetli şeklinde skorlandı.

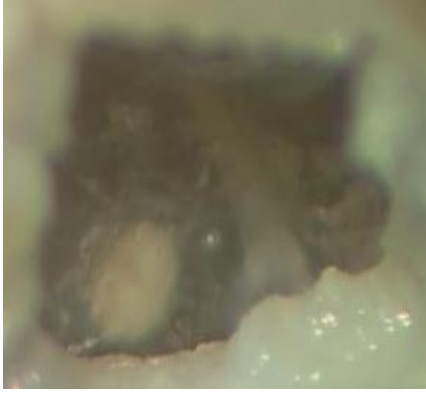
Tablo-4. Otomikroskopik değerlendirme bulguları.

		Miringoskleroz			
Grup	Sayı	MS yok	Hafif MS	Orta MS	Şiddetli MS
		(0)	(+)	(++)	(+++)
M	12	0	3	6	3
M+SF	12	0	2	6	4
M+EGCG	12	5	5	2	0

(M:miringotomi, MS:miringoskleroz, SF: serum fizyolojik, İP: İntro peritoneal, EGCG: Epigallo kateşin 3- gallat)



Şekil-16. M+ EGCG grubunda miringsklerozun olmadığı kulak zarı.



Şekil-17. M+SF grubunda hafif derecede miringoskleroz.



Şekil-18. M grubunda şiddetli derecede miringoskleroz.

Otoskobik miringoskleroz skorları SPSS programında Mann-Whitney U Testi ile analiz edildi.

M+EGCG grubu ile M+SF ve M grupları arasında anlamlı istatistiksel fark bulundu ($P < 0,05$). M ile M+SF grupları arasında anlamlı istatistiksel fark bulunmadı ($P > 0,05$).

EGCG tedavisi alan grupta miringoskleroz skorları düşük ve normale yakındı. EGCG tedavisi alan grupta otomikroskobik olarak şiddetli MS hiç yok iken SF verilen grupta 4 adet, tedavi almayan grupta 3 adet izlendi. EGCG verilen grupta orta derecede MS sadece 2 kulakta varken SF verilen grupta 6, tedavi almayan grupta 6 adet vardı. Gruplardaki MS'un genel toplamına baktığımızda M+EGCG tedavisi alan grupta 9, M+SF alan grupta 26, M grubunda ise 24 idi.

4.2. Histopatolojik Değerlendirme:

Tablo-5. Çalışmadaki her bir kulağın histopatolojik değerlendirme sonuçları.

Kulaklar	Gruplarda histolojik olarak lamina propriadaki miringoskleroz skorları		
	M	M+SF	M+EGCG
1	2	1	0
2	2	1	1
3	1	2	1
4	1	3	0
5	3	2	2
6	2	1	1
7	1	2	0
8	3	3	2
9	3	3	1
10	1	1	1
11	2	2	0
12	2	3	1

(M:miringotomi, MS:miringoskleroz, SF: serum fizyolojik, EGCG: Epigallo kateşin 3- gallat)

Tablo-6. Histopatolojik olarak gruplardaki miringoskleroz skorlarının değerlendirilmesi.

Grup	Sayı	Histopatolojik	Olarak	Miringoskleroz	
		MS yok (0)	Hafif MS (+)	Orta MS (++)	Şiddetli MS (+++)
M	12	0	4	5	3
M+SF	12	0	4	4	4
M+EGCG	12	4	6	2	0

(M:miringotomi, MS:miringoskleroz, SF: serum fizyolojik, EGCG: Epigallo kateşin 3- gallat)

Histopatolojik olarak EGCG tedavisi alan grupta şiddetli MS hiç gözükmez iken M grubunda 3, M+SF grubunda 4 kulakta gözükte. M ve M+SF gruplarında MS'un olmadığı kulak yok iken EGCG alan grupta 4 adet bulunmaktaydı. M+EGCG grubu ile M ve M+SF grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu($P<0,05$). M ile M+SF grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($P>0,05$).

4.3. Biyokimyasal Analiz:

Biyokimyasal analiz ratlar miringotomiden 20 gün sonra bullaları çıkarılırken kalplerinden de aynı zamanda kanları alındı. Alınan kanlardan SOD, CAT, GPx ve MDA düzeyleri çalışıldı. Çalışılan sonuçlar Tablo 7'de görülmekte.

Her bir grupta SOD, CAT, GPx ve MDA düzeylerinin istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı olup olmadığına bakıldı. SPSS programında One-Way Anova analizi uygulandı.

Biyokimyasal analiz sonucuna göre CAT, MDA ve SOD düzeylerinde EGCG tedavisi alan grupta diğer gruplar arasında anlamlı farklar bulundu. GPx'de gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu.

Epigallokateşin-3-gallat alan grupta, SOD ve CAT düzeyi diğer gruplara göre yüksek, MDA düzeyi EGCG alan grupta diğer gruplara göre düşük tespit edildi.

Tablo-7. Rat kanlarında çalışılan CAT, MDA, SOD, GPx düzeyleri.

Gruplar	Fare No	cat Ü/gr hb	mda nmol/ml	sod ü/gr hb	gpx ü/gr hb
M	1	0.861	71.71	2264.0	183,92
	2	0.506	49.19	2015.66	1347,1
	3	0.657	67.8	1793.97	1899,35
	4	1.083	82.31	981.53	226,02
	5	0.422	68.56	444.25	271,26
	6	1.254	72.72	1314.1	1895,14
M+SF	1	0.677	65.25	1702.22	1585,8
	2	0.780	61.92	1333.51	3156,96
	3	0.140	61.92	1384.17	2298,83
	4	0.663	68.34	1140.0	1106,75
	5	0.650	76.48	1593.0	1742,86
	6	0.290	68.15	1507.83	1799,82
M+EGCG	1	1.137	47.99	2276.74	1575,55
	2	1.314	56.89	2361.2	786,49
	3	0.994	52.23	3846.31	950,67
	4	1.099	55.38	2207.0	1096,5
	5	1.216	59.17	2299.04	874,85
	6	1.095	53.55	1474.9	1662,17

(CAT:katalaz, MDA:malondialdehit, SOD:süperoksit dismutaz, GPx:glutatyon peroksidaz, M:miringotomi, SF:serum fizyolojik, EGCG: epigallo kateşin 3-gallat)

5. TARTIŞMA

Timpanik membran perforasyonları klinik olarak sık karşılaşılan bir durum olmasına rağmen gerçek insidansı tam olarak bilinmemektedir. Tüm dünyada tahmin edilen insidansı %1 in altında olduğu bildirilse de gerçek değerin daha fazla olduğu düşünülmektedir [72]. Yapılan bir çalışmada Amerika Birleşik Devletlerinde toplumun ortalama %1-3 ünün etkilendiği bildirilmiştir [73]. Timpanik membran perforasyonları ve tedavisinde uygulanacak yöntemler uzun yıllardır araştırılmaktadır. Timpanik membran perforasyonlarının nedenlerine göz atacak olursak enfeksiyon, timpanostomi tüpü takılması ve travmalardır [74, 75].

Çocuklarda akut otitis media en sık görülen hastalıklarından biridir. Hastalık az gelişmiş ülkelerdeki sosyoekonomik seviyesi düşük olan ailelerin çocuklarında daha fazla görülmektedir. Çocukların %85 gibi büyük bir kısmı 5 yaşına gelinceye kadar en az bir kez akut otitis media geçirmektedir. Bu akut otitlerin %95'i tedavisiz kendiliğinden düzelmesine karşın, %5'i kronikleşip oluşan perforasyonlar kalıcı hal alabilmektedir [76].

Timpanik membran perforasyonu yapan nedenler arasında travma enfeksiyonlardan sonra ikinci sırada gelmektedir. Transfers temporal kemik kırıkları ile kulağın delici ve batıcı travmaları da timpanik membranda perforasyona sebep olabilmektedir [77]. Çeşitli nedenlerden dolayı perfore olan timpanik membranın iyileşmesi sırasında membranda miringoskleroz oluşmaktadır. Miringoskleroz timpanik membranın belirli alanlarında kollajen tabakasının hiyalinizasyon ve kalsifikasyonu ile karakterize olup beyaz kireç lekeleri şeklinde görülür. Histolojik olarak lamina propria içerisinde kollajen liflerinde artışın yanısıra hiyalin dejenerasyonu ve ekstrasellüler kalsiyum birikimi de olmaktadır [1].

Timpanoskleroz sadece timpanik membranda sınırlı ise miringoskleroz adını almaktadır.

Timpanoskleroz teriminin tarihsel gelişimine baktığımız zaman ilk olarak Cassebahn timpanosklerozu timpanik membranda kireçli yamalar şeklinde tarif etmiş [4], Von Trosch 1873 de ilk kez skleroz terimini eklemiştir [5], Zollner 1956 yılında timpanoskleroz olarak adlandırmıştır [6]. Bu süreçte sklerotik plaklar çoğunlukla muayene esnasında timpanik membranda görüldüğünden dolayı da miringoskleroz olarak ifade edilmektedir [7].

Timpanoskleroz, orta kulağın irreversible, nonspesifik, kronik enfeksiyon yada inflamasyon bulgusudur [78, 79]. Oluşumuyla ilgili bir çok hipotez ortaya atılmasına rağmen etyopatogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır [3, 5]. Bununla birlikte miringoskleroz etyolojisinde genellikle ventilasyon tüpü takılması, intratimpanik hemoraji, orta kulak iltihabı, doku travması, çeşitli kimyasal ajanlar, hiperoksijenizasyon, efüzyonlu otitis media ve immünite olarak gösterildiği gibi genetik yatkınlık ve lokal metabolik değişikliklerde miringoskleroz etyolojisinde suçlanmaktadır [2, 3, 5, 78-80].

Miringotomi, efüzyonlu otitis media tedavisinde ventilasyon tüpü takmak için sık olarak yapıldığı gibi akut otitis media da ağrıyı azaltmak ve aynı zamanda orta kulaktaki sekresyonların drenajını sağlamak amaçlı da yapılabilmektedir. Ventilasyon tüpü uygulanan çocuklarda miringoskleroz insidansı %28 ile 61 arasında değişmektedir. Çeşitli serilerde kronik orta kulak enfeksiyonlu hastalarda timpanoskleroz gelişim insidansı %7 ile 33 arasında rapor edilmiştir. Kronik otitis mediada miringoskleroz gelişme insidansı ise %24 ile 52 arasında olup timpanoskleroz gelişme insidansından daha fazladır [3, 5].

Kulak zarında yara iyileşmesi başlangıçtaki hemostatik ve inflamatuvar evreler normalden proliferasyon ve migrasyon evrelerinde diğer dokulardan tamamen farklı özellikler içermektedir. Çoğu yara iyileşmesinde, granülasyon dokusu reepitelizasyon için yatak görevi yaparken, timpanik membranda ise tamamen farklı olup skuamöz epitel tabakası başlangıçta yara üzerinde bir köprü oluşturur. Bunu fibröz komponentin yeniden şekillenmesi izler ve meydana gelen yeni zarın incelmesinde fibröz tabakanın yeniden şekillenmesi önemli rol oynar [20, 26, 81, 82].

Miringoskleroz otoskopik kulak muayenesinde kulak zarı üzerinde yerleşmiş değişik şekil ve boyutlardaki kalsifiye beyaz plaklar şeklinde izlenmektedir. Histolojik incelemede ise sklerotik lezyonların lamina propriadaki düzensiz kollajen lifler arasında yerleşmiş olan kalsiyum fosfat içerikli mineralize birikimlerden meydana geldiği görülmektedir [83, 84].

Mattsson ve arkadaşlarının bildirdiğine göre miringotomi sonrası timpanik membranda sklerotik değişikliklerin 9. saatte geliştiği yönündedir. Timpanik membranın sağ üst kadranına uygulanan miringotomiyi takiben yapılan ışık mikroskopik incelemede, 12-24 saatte pars fleksida da ağır inflamatuvar cevap olduğunu bildirmişlerdir [85]. Oluşan sklerotik plakların yerleştiği bölgeler sıklıkla kulak zarı olmakla birlikte kemikçik zincir, orta kulak mukozası, mastoid hücreler ve iç kulak

yapılarıdır. Zardaki sınırlı skleroz varlığı çoğunlukla bir bulgu vermese de, zarı yaygın olarak tutan, kemikçik zinciri, promontoriumu ve iç kulak yapılarını etkileyen timpanoskleroz ileri derecede işitme kaybına yol açıyorsa başarılı bir tedavi sonucu elde etmek oldukça zordur [7, 86]. Bundan dolayı uygulanan cerrahi sonrası nükslerin fazla olması, yüz güldürücü sonuçların alınamaması uzmanları tedavi yerine önleyici araştırmalar yapmaya itmiştir [3, 87].

Bu doğrultuda yapılan bir çok araştırmada zarın iyileşmesi ve miringosklerozun oluşum süreci incelenip miringoskleroza sebep teşkil eden durumlar araştırılıp tedavide kullanılacak alternatifler üzerinde çalışılmıştır [80, 88-91].

Miringosklerozun oluşumunu ortaya koyma amaçlı bir çok hipotez ortaya atılmıştır.

Schiff ve ark. orta kulakta inflamatuvar reaksiyona bağlı lokal antikorların kompleman sistemini aktive eden immünolojik teoriyi öne sürerlerken [35], başka bir çalışma da ise fibröz hiperplazi ve timpanik membranda ventilasyon tüp varlığında zarın hareketinin engellenmesine bağlı olarak kalsifikasyon gelişebileceğini bildirmişlerdir [36]. Kulak zarına ventilasyon tüpünün yerleştirilmesi sırasında orta kulaktaki efüzyonun aspire edilmesi ve intratimpanik kanamanın da timpanoskleroz oluşumu için predispozan faktör olabileceği öngörülmüştür [37].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ventilasyon tüp takılması veya timpanik membran travması sonrası miringoskleroz gelişimi ile reaktif oksijen ürünlerinin arasında ilişkili olduğu ortaya konmuştur [8, 9].

Timpanik membrana ventilasyon tüpü takılması dışardaki havanın orta kulak kavitesine girişine izin verir ve bu relatif bir hiperoksik durum oluşturur [39]. Bu relatif hiperoksi, oksijenden kaynaklanan serbest radikallerin üretiminde artışa ve bunun sonucu olarak da sklerotik plakların gelişimiyle ilgili sürecin başlamasında ilişkili olabilir [40].

Ayrıca hayvanlar üzerinde yapılan daha sonraki çalışmalar farklı antioksidanların miringoskleroza önleyici etkiye sahip olduğunu göstermiştir [1, 10].

Üneri ve ark., E vitamini ile yaptıkları çalışmada, ventilasyon tüpü takılan 72 çocuğun operasyon sırasında sağ kulaklarına miringotomi sonrası ve ventilasyon tüpünü taktıktan sonra olmak üzere iki kez vitamin E damlası uygulayıp sol kulağına bir tedavi vermeden takip etmişler. Dokuz ay sonrasında vitamin E uygulanan sağ kulakların %15,3 ünde, tedavi verilmeyen sol kulakların %30,6 sında miringoskleroz geliştiğini gözlemlemişler [89].

Son alışmalar orta kulak boşluğunda hiperoksik durumun bir sonucu olarak oksijenden turetilmiş serbest radikallerin artan yapımları nedeniyle miringosklerozun gelişebileceğini gostermiştir [1, 9, 90]. Bundan yola çıkararak Mattson ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, miringotomi yapılan sıçanları farklı oksijen konsantrasyonlarına maruz bırakmışlar ve orta kulak kavitesinde artmış oksijen konsantrasyonları ile miringoskleroz oluşumunun doğru orantılı olduğunu ortaya koymuşlar. Bu çalışmada ratlar %40 lara varan yuēsek O₂ konsantrasyonunda tutulmuşlar ve normal atmosfer basıncındakilerle karşılaştırıldığında miringosklerozun daha fazla oluştuğunu bulmuşlar. Miringoskleroz oluşumunda en önemli faktoruēn hiperoksik ortamda salınan siper oksit radikallerinin dokuda meydana getirdiği hasar olduğunu bildirmişlerdir [9].

Mattsson ve arkadaşlarının bu hipotezini destekleyen başka bir çalışmada ise, artmış oksijen konsantrasyonunda tutulan farelerin travmatize edilen kulak zarlarına bakır çinko siperoksit dismutaz (SOD) + CAT + deferoksamin veya bakır sulfat + demir kloruē içeren solusyonların uygulanması sonucunda bakır inko SOD +CAT'ın ve deferoksaminin MS gelişimini azalttığını veya inhibe ettiğini bildirmişlerdir [1].

Çok toksik bir serbest radikal olan peroksinitrit, akut inflamasyon sırasında yuēsek miktarda sentezlenen nitrik oksitin (NO) hiperoksik ortamda ortaya çıkan siperoksit radikali ile reaksiyona girmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Peroksinitrit, NO'nun toksik etkilerinin oluşumundan primer sorumlu maddedir. Siperoksit radikalinin detoksifikasyonunu ise antioksidan bir enzim olan SOD sağlamaktadır. NO'nun siperoksitle reaksiyona girmesi ve peroksinitrit oluşturması SOD'un siperoksit radikalini ortamdaki uzaklaştırması sayesinde engellenmiş olur. Bolelikle son derece toksik bir madde olan peroksinitritin dokuda oluşturacağı zararın onune geçilmiş olur. İltihabi surete oluşan peroksinitritin meydana getirdiği doku hasarı fibrozis ile iyileşmektedir. Zarın lamina propriasında kolajen liflerinde artışın yanısıra hiyalin dejenerasyonu ve son olarak ekstraselluler kalsiyum birikimi de olmasıyla birlikte sklerotik plak oluşumu sona ermiş olur [92].

Spratley ve arkadaşlarının topikal askorbik asit kullanılarak yaptiğı çalışmada miringotomi uygulanan rat kulaklarında askorbik asidin miringoskleroz oluşumunu azalttığını gormuşlerdir [90].

Ozcan ve arkadaşları N-asetilsistein (NAC) in değişen konsantrasyonlarını miringotomi yapılan rat timpanik membranlarına uyguladıklarında NAC'ın sklerotik lezyonların gelişiminin onlenmesinde etkili olduğunu bulmuşlardır [91].

Bir başka çalışmalarında ise intraperitoneal olarak uygulanan sistemik selenyum kullanımının rat kulaklarında miringoskleroz oluşumunu azalttığını göstermişlerdir [93].

Yıldırım ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada intraperitoneal olarak çinko aspartat uygulanan miringotomili kulaklarda çinko aspartatın sıçan timpanik membranında miringoskleroz gelişimini azalttığı veya önlediği bildirilmiştir [88].

Akbaş ve arkadaşları ratlara miringotomi uyguladıktan sonra intraperitoneal olarak L-karnitin vermişler ve çalışma sonucunda kontrol grubuna göre L-karnitin uygulanan ratların timpanik membranlarında miringoskleroz gelişiminin daha az olduğunu görmüşler [7].

EGCG yeşil çaydaki predominant kateşin olup güçlü bir antioksidan olarak radikal temizleyici, redüksiyon ve metal şelasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir [57]. EGCG nin lipozom oksidasyonu, DNA kırılması ve LDL oksidasyonuna karşı inhibitör etkisini de içeren biyolojik sistemlerdeki anti-oksidan aktivitesi in-vitro ve in-vivo birçok çalışmada rapor edilmiştir [58, 59].

EGCG' nin protektif özelliğinin hücrel mekanizması henüz net olmamakla birlikte nitrik oksit ve oksidatif stres yollarının etkisi olduğu düşünülmektedir. EGCG çeşitli mekanizmalarla oksidatif strese karşı, kısa ve uzun dönem koruma sağlamaktadır [59].

Literatüre baktığımızda EGCG'nin miringoskleroz ve oksidatif parametreler üzerine etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda EGCG yi kullanmamızın bir nedeni de bu maddenin doğada bol olarak bulunup ucuz ve güçlü antioksidan etkisinin olmasından dolayıdır.

Çalışmamızda M+EGCG grubunda, M ve M+SF gruplarına göre miringoskleroz otomikroskopik ve histolojik olarak anlamlı bulundu. Histopatolojik olarak miringoskleroz dikkate alındığında, EGCG'nin miringosklerozu M+EGCG grubunda M ve M+SF gruplarına göre, istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı görülmüştür. Miringotomi sonrası intraperitoneal olarak uyguladığımız EGCG'nin peroksinitrit oluşumunu önleyerek doku hasarını azaltmasının yanında kollajen matriksteki kalsifikasyonu da azaltarak miringoskleroz gelişimini engellediğini düşünmekteyiz.

Özellikle yeşil çayda bol miktarda bulunan polifenollerden biri olan EGCG'nin etkili bir antioksidan olup reaktif oksijen ürünlerinin güçlü bir temizleyicisi olduğu birçok kaynakta da yer almaktadır [54, 94, 95].

Oksidatif stres, prooksidan antioksidan dengesinin prooksidan yönüne kayması sonucu potansiyel hücrel hasarlara yol açması olayı olarak tanımlanabilir [96]. Oksidatif stres durumu, düzeltme ve onarım yapan karmaşık endojen savunma sistemleri olduğundan ötürü ölçümü zor olabilir. Serbest radikal üretiminin artışı ve antioksidan savunmanın azalması sonucu oksidatif stres oluşabilmekte. Bu özellik kullanılarak oksidatif stres biyobelirteci olarak antioksidan tüketiminin araştırılması, antioksidan miktarlarındaki azalış veya onların metabolitlerindeki artışın ölçümü ile yapılabilmektedir [97].

Organizmada serbest radikallere karşı savunma sisteminde öncelikle enzim sistemi etkili olmaktadır. Serbest radikallerin birikimini ve lipid peroksidasyonun başlamasını önleyen enzimler SOD, GPx ve CAT'dır. Süperoksidin hidrojen perokside dönüşümünü SOD katalizlerken, CAT ve GPx ise SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksidi dokulardan uzaklaştıran reaksiyonlarda rol üstlenirler [98, 99]. SOD, GPx ve CAT'ın aktivitesindeki azalma, hücre membranının bütünlüğünü ve fonksiyonunu bozan serbest radikal miktarındaki artmayla bağlantılıdır [100].

Sağlıklı dokularda çok düşük düzeylerde olan lipid peroksidasyonun artışı serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu doku hasarının göstergesi olarak kullanılabilir. Lipid peroksidasyonu yıkım ürünlerinden birisi de MDA'dır. Serumdaki MDA düzeyinin ölçümü in vivo serbest oksijen radikalleri aracılı doku hasarının bir göstergesi olarak kullanılabilir [52].

Çalışmamızda oksidatif stres parametreleri olarak sıçan kanında SOD, CAT, GPx ve MDA düzeylerini araştırdık.

Epigallokateşin-3-gallat alan grupta, SOD ve CAT düzeyinin diğer gruplara göre yüksek olmasının sebebi olarak EGCG'nin antioksidan etki ile enzim sisteminin azalmasının önüne geçmiş olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Aynı şekilde organizmada oksidatif stres göstergesi olan MDA'nın EGCG alan grupta diğer gruplara göre düşük düzeyde kalması da aldığı antioksidan sayesinde oksidatif stres yükünün azaldığı anlamına gelmekteydi.

6. SONUÇ

Kulak zarına yönelik yapılan işlemlerde SOR' un timpanoskleroz gelişim sürecinde etkili olduğu ve bunu önlemede antioksidan savunma sistemlerinin güçlendirilmesi yada desteklenmesi adına yapılan çalışmaların yararlı olabileceği görülmüştür. Ayrıca çalışmamızda kullanılan EGCG'nin ratların çalışılan kanlarında da antioksidan parametreler üzerine olumlu etkilerinin olduğu anlaşılmıştır. Ancak antioksidanların miringosklerozu önlemede ne derecede etkili olabileceğini anlamak için daha ileri çalışmalar ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Mattsson, C., S.L. Marklund, and S. Hellstrom, Application of oxygen free radical scavengers to diminish the occurrence of myringosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1997. 106(6): p. 513-8.
2. Dursun, G., et al., Human leucocyte antigens in tympanosclerosis. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 1997. 22(1): p. 62-4.
3. Asiri, S., et al., Tympanosclerosis: review of literature and incidence among patients with middle-ear infection. *J Laryngol Otol*, 1999. 113(12): p. 1076-80.
4. Gibb, A.G., President's address. Tympanosclerosis. *Proc R Soc Med*, 1976. 69(3): p. 155-62.
5. Wielinga, E.W. and A.G. Kerr, Tympanosclerosis. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 1993. 18(5): p. 341-9.
6. Zollner, F., Tympanosclerosis. *J Laryngol Otol*, 1956. 70(2): p. 77-85.
7. Akbas, Y., et al., The effect of L-carnitine on the prevention of experimentally induced myringosclerosis in rats. *Hear Res*, 2003. 184(1-2): p. 107-12.
8. Mattsson, C., K. Magnuson, and S. Hellstrom, Myringotomy: a prerequisite for the development of myringosclerosis? *Laryngoscope*, 1998. 108(1 Pt 1): p. 102-6.
9. Mattsson, C., K. Magnuson, and S. Hellstrom, Myringosclerosis caused by increased oxygen concentration in traumatized tympanic membranes. Experimental study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1995. 104(8): p. 625-32.
10. Polat, S., et al., Determination of reactive oxygen species in myringotomized tympanic membranes: effect of vitamin e treatment. *Laryngoscope*, 2004. 114(4): p. 720-5.
11. Biasibetti, R., et al., Green tea (-)epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia. *Behav Brain Res*. 236(1): p. 186-93.
12. Applebaum, E.L. and E.C. Deutsch, An endoscopic method of tympanic membrane fluorescein angiography. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1986. 95(5 Pt 1): p. 439-43.
13. Akyıldız, A.N., *Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi*. Vol. 1. 1998, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi.

14. Putz R, P.R., Sobotta İnsan Anatomisi Atlası 20 ed. 1993, München: R. Oldenburg.
15. LG, D., Anatomy of the skull base, temporal bone, external ear and middle ear. 1998, St. Louis.
16. Odar, İ.V., Anatomi. 12 ed. 1978, Ankara: Elif Matbacılık.
17. Castagno, L.A. and L. Lavinsky, Tympanic membrane healing in myringotomies performed with argon laser or microknife: an experimental study in rats. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2006. 72(6): p. 794-9.
18. Ballanger, J.J., Snow, B.S., Otorhinolaryngology Head end Neck Surgery. 15 ed. 1996: Williams&Wilkins.
19. Netter, F.H., İnsan Anatomisi Atlası Netter. 2011.
20. Guneri, E.A., et al., The effects of hyaluronic acid, epidermal growth factor, and mitomycin in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol*, 2003. 24(3): p. 371-6.
21. Johnson, A.P., L.A. Smallman, and S.E. Kent, The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. A two-dimensional histological study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol*, 1990. 109(5-6): p. 406-15.
22. Ozkaptan, Y., et al., Effects of fibroblast growth factor on the healing process of tympanic membrane perforations in an animal model. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1997. 254 Suppl 1: p. S2-5.
23. Johnson, A. and M. Hawke, The function of migratory epidermis in the healing of tympanic membrane perforations in guinea-pig. A photographic study. *Acta Otolaryngol*, 1987. 103(1-2): p. 81-6.
24. Kent, S.E. and P.H. Rhys-Evans, Thermal myringotomy in guinea pigs. *J Laryngol Otol*, 1987. 101(2): p. 103-15.
25. von Unge, M. and M. Hulcrantz, The early events in the healing of laser-produced tympanic membrane perforation. *Acta Otolaryngol*, 2011. 131(5): p. 480-7.
26. Govaerts, P.J., W.A. Jacob, and J. Marquet, Histological study of the thin replacement membrane of human tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol*, 1988. 105(3-4): p. 297-302.
27. Oktay, M.F., et al., Tympanic membrane changes in central tympanic membrane perforations. *Am J Otolaryngol*, 2005. 26(6): p. 393-7.

28. Wang, W.Q., Z.M. Wang, and F.L. Chi, Spontaneous healing of various tympanic membrane perforations in the rat. *Acta Otolaryngol*, 2004. 124(10): p. 1141-4.
29. Mondain, M. and A. Ryan, Histological study of the healing of traumatic tympanic membrane perforation after basic fibroblast growth factor application. *Laryngoscope*, 1993. 103(3): p. 312-8.
30. Spratley, J., et al., Early structural tympanic membrane reactions to myringotomy: a study in an acute otitis media model. *Acta Otolaryngol*, 2002. 122(5): p. 479-87.
31. Stenfeldt, K., C. Johansson, and S. Hellstrom, The collagen structure of the tympanic membrane: collagen types I, II, and III in the healthy tympanic membrane, during healing of a perforation, and during infection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2006. 132(3): p. 293-8.
32. Knutsson, J., D. Bagger-Sjoberg, and M. von Unge, Distribution of different collagen types in the rat's tympanic membrane and its suspending structures. *Otol Neurotol*, 2007. 28(4): p. 486-91.
33. Ramalho, J.R. and R.F. Bento, Healing of subacute tympanic membrane perforations in chinchillas treated with epidermal growth factor and pentoxifylline. *Otol Neurotol*, 2006. 27(5): p. 720-7.
34. Mattsson, C., C. Johansson, and S. Hellstrom, Myringosclerosis develops within 9h of myringotomy. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 1999. 61(1): p. 31-6.
35. Schiff, M. and T.J. Yoo, Immunologic aspects of otologic disease: an overview. *Laryngoscope*, 1985. 95(3): p. 259-69.
36. Tos, M., P. Bonding, and G. Poulsen, Tympanosclerosis of the drum in secretory otitis after insertion of grommets. A prospective, comparative study. *J Laryngol Otol*, 1983. 97(6): p. 489-96.
37. McRae, D., et al., Aspiration of middle ear effusions prior to grommet insertion an etiological factor in tympanosclerosis. *J Otolaryngol*, 1989. 18(5): p. 229-31.
38. Mattsson, C. and S. Hellstrom, Inhibition of the development of myringosclerosis by local administration of fenspiride, an anti-inflammatory drug. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1997. 254(9-10): p. 425-9.
39. Felding, J.U., J.B. Rasmussen, and T. Lildholdt, Gas composition of the normal and the ventilated middle ear cavity. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1987. 186: p. 31-41.

40. Mattsson, C., et al., Myringotomized mice develop myringosclerosis in the pars flaccida and not in the pars tensa. *Laryngoscope*, 1997. 107(2): p. 200-5.
41. Onat T, E.K., Sözmen E.Y. , İnsan Biyokimyası 2002, Ankara Palme yayıncılık
42. Halliwell, B., Aruoma, O. I. , Free radicals and antioxidants: The need for in vivo Markers of Oxidative stress. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 1998. 75(2): p. 199-212.
43. Valko, M., et al., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 2006. 160(1): p. 1-40.
44. Rice-Evans, C., Miller, A., Paganga, N.J., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 1996. 20(7): p. 933-56.
45. Demirsoy, A., Türkan, İ., Gündüz, G. , Genel Biyoloji. . 2003.
46. Cadenas, E., Packer, L. , Handbook of Antioxidants
2001: CRC Press.
47. Rice-Evans, C.A., Miller, N. J., Paganga G. , Antioxidant properties of phenolic compounds. . *Trends in Plant Science*
1997. 2: p. 152-159.
48. Cochrane, C.G., Cellular injury by oxidants. . *Am J Med* 1991. 91: p. 323-30.
49. Parantainen J, V.H., Hokkanen E. , Clinical aspects of prostaglandins and leukotriens in migraine. *Cephalalgia*, 1986. 6: p. 95-100..
50. Freeman, B.A., Crapo, J.D., Biology of disease. Free radicals and tissue injury. . *Lab Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 1982. 47: p. 412-26.
51. Mercan, U., Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet. Fak. Derg.*, 2004. 15(1-2): p. 91-96.
52. Torun, M., Yardım, S., Gönenç, A., Sargın, H. , Çeşitli kanser vakalarında serum MDA düzeyleri. *Biyokimya dergisi*, 1995. 20: p. 1-7.
53. Del Rio, D., A.J. Stewart, and N. Pellegrini, A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2005. 15(4): p. 316-28.
54. Guo, Q., et al., Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochim Biophys Acta*, 1996. 1304(3): p. 210-22.

55. Yang, C.S., et al., Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1998. 7(4): p. 351-4.
56. Liao, S., Y.H. Kao, and R.A. Hiipakka, Green tea: biochemical and biological basis for health benefits. *Vitam Horm*, 2001. 62: p. 1-94.
57. Chan, E.W.C., Lim, Y. Y., & Chew, Y. L. , Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chemistry*, 2007. 102: p. 1214-1222.
58. Hu, C., & Kitts, D. D. , Evaluation of antioxidant activity of epigallocatechin gallate in biphasic model systems in vitro. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2001. 218: p. 147-155.
59. Yao, K., et al., Epigallocatechin gallate protects against oxidative stress-induced mitochondria-dependent apoptosis in human lens epithelial cells. *Mol Vis*, 2008. 14: p. 217-23.
60. Zhong, Y. and F. Shahidi, Lipophilized epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives as novel antioxidants. *J Agric Food Chem*. 59(12): p. 6526-33.
61. Doss, M.X., et al., Trapping of growth factors by catechins: a possible therapeutic target for prevention of proliferative diseases. *J Nutr Biochem*, 2005. 16(5): p. 259-66.
62. Weinreb, O., et al., Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neuritogenic properties. *Genes Nutr*, 2009. 4(4): p. 283-96.
63. Fu, Z., et al., Epigallocatechin gallate delays the onset of type 1 diabetes in spontaneous non-obese diabetic mice. *Br J Nutr*. 105(8): p. 1218-25.
64. Roghani, M. and T. Baluchnejadmojarad, Hypoglycemic and hypolipidemic effect and antioxidant activity of chronic epigallocatechin-gallate in streptozotocin-diabetic rats. *Pathophysiology*. 17(1): p. 55-9.
65. Kandinov, B., N. Giladi, and A.D. Korczyn, Smoking and tea consumption delay onset of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 2009. 15(1): p. 41-6.
66. Devika, P.T. and P. Stanely Mainzen Prince, Protective effect of (-)-epigallocatechin-gallate (EGCG) on lipid peroxide metabolism in isoproterenol induced myocardial infarction in male Wistar rats: a histopathological study. *Biomed Pharmacother*, 2008. 62(10): p. 701-8.

67. Babu, P.V. and D. Liu, Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem*, 2008. 15(18): p. 1840-50.
68. Beutler, E.R.C.M.n.e.G.a.S.C., New York, 1975:261-265.
69. Fridovich, I., Superoxide dismutase. . *Adv Enzymol*, 1974. 41: p. 35-97.
70. Ohkawa H, O.N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351-358.
71. Beutler, E.R.c.m.I.A.M.o.B.M.G.a.S., New York, 67-69., 1975.
72. Cohen, D. and D. Tamir, The prevalence of middle ear pathologies in Jerusalem school children. *Am J Otol*, 1989. 10(6): p. 456-9.
73. Somers, T., et al., Growth factors in tympanic membrane perforations. *Am J Otol*, 1998. 19(4): p. 428-34.
74. Ibekwe, T.S., G.T. Ijaluola, and O.G. Nwaorgu, Tympanic membrane perforation among adults in West Africa. *Otol Neurotol*, 2007. 28(3): p. 348-52.
75. Voss, S.E., et al., Non-ossicular signal transmission in human middle ears: Experimental assessment of the "acoustic route" with perforated tympanic membranes. *J Acoust Soc Am*, 2007. 122(4): p. 2135-53.
76. Roberts, J.E., et al., Otitis media in early childhood and cognitive, academic, and classroom performance of the school-aged child. *Pediatrics*, 1989. 83(4): p. 477-85.
77. Çakır, N., *Otolaringoloji, Bas ve Boyun Cerrahisi*. . 2 ed. 1999, İstanbul.: Nobel Tıp Kitabevleri. p.1-12.
78. Celik, H., et al., Analysis of long-term hearing after tympanosclerosis with total/partial stapedectomy and prosthesis used. *Acta Otolaryngol*, 2008. 128(12): p. 1308-13.
79. Emir, H., et al., The preventive effect of ginkgo biloba extract in myringosclerosis: study in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2009. 140(2): p. 171-6.
80. Selcuk, A., et al., Topical application of calcium channel blockers to reduce the progression of experimentally induced myringosclerosis and tympanosclerosis. *Laryngoscope*, 2008. 118(4): p. 697-705.
81. Johnson, A. and M. Hawke, An ultrastructural study of the skin of the tympanic membrane and external ear canal of the guinea pig. *J Otolaryngol*, 1985. 14(6): p. 357-64.

82. Hellstrom, S. and C. Laurent, Hyaluronan and healing of tympanic membrane perforations. An experimental study. *Acta Otolaryngol Suppl*, 1987. 442: p. 54-61.
83. Selcuk, A., et al., Histopathological classification of tympanosclerotic plaques. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2008. 265(4): p. 409-13.
84. Doner, F., et al., The biochemical analysis of tympanosclerotic plaques. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003. 128(5): p. 742-5.
85. Mattsson, C., P. Stierna, and S. Hellstrom, Treatment with dexamethasone arrests the development of myringosclerosis after myringotomy. *Am J Otol*, 2000. 21(6): p. 804-8.
86. Forseni Flodin, M. and M. Hultcrantz, Possible inflammatory mediators in tympanosclerosis development. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2002. 63(2): p. 149-54.
87. Karlidag, T., et al., Comparison of free radicals and antioxidant enzymes in chronic otitis media with and without tympanosclerosis. *Laryngoscope*, 2004. 114(1): p. 85-9.
88. Yildirim, I., et al., The effect of intraperitoneal administration of zinc aspartate on myringosclerosis in perforated tympanic membranes of rats. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*, 2009. 19(5): p. 263-7.
89. Uneri, C., T. Baglam, and M. Yazici, The effect of Vitamin E treatment on the development of myringosclerosis after ventilation tube insertion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2006. 70(6): p. 1045-8.
90. Spratley, J.E., et al., Topical ascorbic acid reduces myringosclerosis in perforated tympanic membranes. A study in the rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2001. 110(6): p. 585-91.
91. Ozcan, C., et al., The inhibitory effect of topical N-acetylcysteine application on myringosclerosis in perforated rat tympanic membrane. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2002. 63(3): p. 179-84.
92. Doğan, E. Rat Timpanik Membranında Deneysel Olarak Oluşturulan Miringoskleroz Gelişim Sürecine N-Nitro L-Arjinin Metil Ester'in Etkisi. Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, 2008.
93. Gorur, K., et al., The anti-oxidant and anti-apoptotic activities of selenium in the prevention of myringosclerosis in rats. *J Laryngol Otol*, 2002. 116(6): p. 426-9.

94. Schroeder, P., Klotz, L.O., Sies, H., Amphiphilic properties of (-) epicatechin and their significance of protection of cells against peroxynitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2003. 307, 69–73.
95. Vinson, J.A., Dabbagh, Y., Serry, M., Jang, J., Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem*, 1995. 43, 2800– 2802.
96. Valko, M., et al., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. 39(1): p. 44-84.
97. Blumberg, J., Use of biomarkers of oxidative stress in research studies. *J Nutr*, 2004. 134(11): p. 3188S-3189S.
98. Halliwell B., G., JMC., Free radicals in biology and medicine. 1989, Oxford: Clarendon Press.
99. Dundar Y., Aslan R., Hekimlikte oksidatif stress ve antioksidanlar. *Afyon Kocatepe Üniv. Yayınları*, Y.N: 29, 2000, Ankara, Uyum Ajans.
100. Freeman, B.A. and J.D. Crapo, Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 1982. 47(5): p. 412-26.