

T.C  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKULTESİ  
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI

**RAT MODELİNDE MITOMİSİN C’NİN TİMPANİK  
MEMBRAN PERFORASYONUNA VE YARA  
İYİLEŞMESİNDE bFGF, TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, KGF-1  
EKSPRESYONUNA ETKİSİ**

**DENEYSEL ÇALIŞMA**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Hatice DURAK**

**Samsun – 2013**

T.C  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKULTESİ  
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI

**RAT MODELİNDE MİTOMİSİN C’NİN TİMPANİK  
MEMBRAN PERFORASYONUNA VE YARA  
İYİLEŞMESİNDE bFGF, TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, KGF-1  
EKSPRESYONUNA ETKİSİ**

**DENEYSEL ÇALIŞMA**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Hatice DURAK**

**TEZ DANIŞMANI**

**Doç. Dr. Sinan ATMACA**

**Samsun – 2013**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Sinan ATMACA' ya saygı ve şükranlarımı sunarım.

Öncelikle Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Recep ÜNAL olmak üzere eğitim süresince mesleki bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum tüm öğretim üyelerine, tez araştırma sürecimde emeği geçen Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Murat YARIM' a, istatistik alanında yardımcı olan Biyoistatistik Anabilim Dalından Prof. Dr. Yüksel BEK' e, PYO. TIP. 1904.11046 proje numaralı tezimi destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Rektörlük Bilimsel Araştırma Proje Yönetim Ofisine ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çocuklarının iyiliğinden başka bir şey düşünmeyen ve her anlamda onlara destek olmaya çalışan sevgili anneme ve babama, her alanda gösterdiği sınırsız anlayış, sevgi ve destekle her zaman yanımda olan sevgili eşim Yıldırım DURAK' a, tez yazım süreci boyunca yanımdan hiç ayrılmayan oğlum Ozan Barış' a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Hatice DURAK

Samsun 2013

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA NO

<b>KISALTMALAR ve SİMGELER</b>	<b>III</b>
<b>RESİM, ŞEKİL ve TABLOLAR</b>	<b>IV</b>
<b>ÖZET</b>	<b>V</b>
<b>İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)</b>	<b>VI</b>
<b>1.GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Efüzyonlu Otitis Media</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Timpanik Membran Histolojisi</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Yara İyileşmesi</b>	<b>6</b>
<b>2.4.Timpanik Membran Yara İyileşmesi</b>	<b>8</b>
<b>2.5. Rat Kulak Anatomisi</b>	<b>9</b>
<b>2.6. Yara İyileşmesi ve Büyüme faktörleri</b>	<b>10</b>
<b>2.7.Mitomisin C</b>	<b>12</b>
<b>3.GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>14</b>
<b>4.İSTATİSTİKSEL ANALİZ</b>	<b>17</b>
<b>5.BULGULAR</b>	<b>18</b>
<b>6.TARTIŞMA</b>	<b>30</b>
<b>7.SONUÇLAR</b>	<b>36</b>
<b>8.KAYNAKLAR</b>	<b>37</b>

## KISALTMALAR ve SİMGELER

**bFGF:** basic Fibroblast Growth Factor

**CO<sub>2</sub>:** Karbondioksit

**dB:** Desibel

**dk:** dakika

**ESM:** Ekstraselüler matriks

**EGF:** Epidermal Growth Factor

**FGF:** Fibroblast Growth Factor

**gr:** Gram

**HADYEK:** Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

**KGF-1:** Keratinocyte Growth Factor-1

**MC:** Mitomisin C

**5-FU:** 5- Fluorourasil

**mg:** Miligram

**ml:** Mililitre

**mm:** Milimetre

**PDGF:** Platelet derived Growth Factor

**TGF- $\alpha$ :** Transforming Growth Factor-  $\alpha$

**TGF-  $\beta$ :** Transforming Growth Factor-  $\beta$

**VEGF:** Vascular endothelial Growth Factor

**$\mu$ m:** Mikrometre

## RESİM, ŞEKİL ve TABLOLAR

- Resim 1:** Rat kulak zarında anestezi sonrası koter ile perforasyon uygulaması
- Resim 2:** Rat sağ kulak zarında oluşturulan perforasyonun görünümü
- Resim 3:** İmmünohistokimyasal boyama sonrası bFGF salınımının görünümü
- Resim 4:** İmmünohistokimyasal boyama sonrası TGF- $\beta_1$  salınımının görünümü
- Resim 5:** İmmünohistokimyasal boyama sonrası KGF-1 salınımının görünümü
- Şekil 1:** Kulak zarı epitel tabakalarının şematik görünümü
- Şekil 2:** Yara iyileşmesi inflamatuvar fazın şematik görünümü
- Şekil 3:** Rat ve insan kulak zarı görünümü
- Şekil 4:** Mitomisin C' nin moleküler yapısı
- Tablo 1:** İmmünohistokimyasal skorlama
- Tablo 2:** İmmünohistokimyasal boyamalarda kullanılan primer antikorlar
- Tablo 3:** Günlere göre gruplardaki tam iyileşen perforasyon sayısı
- Tablo 4:** 3. gün bFGF salınımı sonuçları
- Tablo 5:** 7. gün bFGF salınımı sonuçları
- Tablo 6:** 14. gün bFGF salınımı sonuçları
- Tablo 7:** 30. gün bFGF salınımı sonuçları
- Tablo 8:** 3. gün TGF- $\beta_1$  salınımı sonuçları
- Tablo 9:** 7. gün TGF- $\beta_1$  salınımı sonuçları
- Tablo 10:** 14.gün TGF- $\beta_1$  salınımı sonuçları
- Tablo 11:** 30.gün TGF- $\beta_1$  salınımı sonuçları
- Tablo 12:** 3. gün KGF-1 salınımı sonuçları
- Tablo 13:** 7. gün KGF-1 salınımı sonuçları
- Tablo 14:** 14.gün KGF-1 salınımı sonuçları
- Tablo 15:** 30.gün KGF-1 salınımı sonuçları
- Grafik 1:** Günlere göre iki gruptaki tam iyileşen perforasyon sayısının grafiksel görünümü

## ÖZET

**Amac:** Bu çalışmanın amacı, timpanik membran yara iyileşmesinde topikal mitomisin C' nin büyüme faktörleri salımına etkisini saptamaktır.

**Gereç:** Ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen 20 erkek, 20 dişi toplam 40 Wistar albino cinsi yetişkin rat, 5 eşit gruba ayrıldı. Birinci gruba herhangi bir işlem uygulanmadan sakrifiye edilerek normal timpanik membranları eksize edildi. Diğer ratların her iki kulaklarına koter miringotomi işlemi uygulandı. Bu ratların sağ kulak zarı perforasyonu üzerine 0,4 mg/ ml mitomisin C, sol kulak zarı perforasyonu üzerine ise salin içeren gelfoamlar 5 dk süre ile uygulandı. İkinci, 3, 4 ve 5. gruplar sırası ile 3, 7, 14 ve 30. günlerde perforasyon kapanma durumları otomikroskopik olarak kontrol edildikten sonra sakrifiye edildi. Ratların perforasyon kapanma durumları salin ve mitomisin C grubunda kaydedildikten sonra karşılaştırıldı. Tüm gruplarda kulak zarında epitel, fibroblast, makrofajlarda TGF- $\beta_1$ , bFGF, KGF-1 salınımları immünohistokimyasal boyama yöntemi ile değerlendirildi ve sonuçlar karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Salin ve mitomisin C grubunda 7 ve 14. günde tam iyileşen perforasyon sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu. Bu günlerde mitomisin C grubunda salin grubuna göre tam iyileşen perforasyon sayısının anlamlı olarak daha az olduğu görüldü( $p < 0,05$ ). İmmünohistokimyasal değerlendirmede iki grup arasında günler arasında bFGF, KGF-1 salınımı açısından anlamlı fark gözlenmedi. TGF- $\beta_1$  salınımı 3.günde zar makrofajlarında mitomisin C grubunda salin grubuna göre anlamlı olarak fazlaydı( $p = 0,001$ ).

**Sonuç:** Mitomisin C' nin akut travmatik timpanik membran perforasyonlarına uygulanması perforasyon kapanma süresini geciktirmektedir. Perforasyon sonrasında timpanik membranda TGF- $\beta_1$ , bFGF, KGF-1 salınımları farklı günlerde artmaktadır. Mitomisin C, bFGF ve KGF-1 salınımlarını kontrol grubuna göre anlamlı fark yaratacak düzeyde etkilemezken, 3. günde TGF- $\beta_1$  salınımını arttırmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** timpanik membran yara iyileşmesi, mitomisin C, TGF- $\beta_1$ , bFGF, KGF-1

## ABSTRACT

**Aim:** The purpose of this study is to evaluate the effect of topical mitomycin C on growth factor expression in tympanic membrane wound healing.

**Method:** Forty -twenty male and twenty female- adult Wistar albino rats, varied 250-300 grams in weight were divided into five groups. In the first group, no intervention was performed, the intact tympanic membranes were excised after the rats were sacrificed. In the other groups, both ears of rats underwent an electrocautery myringotomy procedure. Gelfoams soaked in 0,4 mg/ml mitomycin C solution were applied to the perforations of the right sided ears for 5 minutes, and saline solution to the left side with the same manner. Second, 3rd, 4th and 5th groups were examined otomicroscopically for perforation closure and were sacrificed sequentially on the 3rd, 7th, 14th and 30th days. Closure formation at the perforations were noted and compared between the groups. In all groups, TGF- $\beta_1$ , bFGF, KGF-1 expressions of tympanic membrane epithelia, fibroblasts and macrophages were evaluated by immunohistochemical staining and compared among the groups.

**Results:** Number of complete perforation closure was significantly lesser in the mitomycin C group with respect to saline group on the 7th and the 14th days ( $p < 0.05$ ). At immunohistochemical study, no significant differences in bFGF, KGF-1 expressions were observed between groups with an exception; on the 3rd day, expression of TGF- $\beta_1$  from macrophages were more elevated in the mitomycin C group when compared with the saline group ( $p = 0,001$ ).

**Conclusion:** Application of mitomycin C to the acute tympanic membrane perforations delays the closure duration. After the perforation is created, TGF- $\beta_1$ , bFGF, KGF-1 expressions elevate on different days in the tympanic membranes. Mitomycin C has insignificant effects on the expressions of bFGF and KGF-1, but a remarkable elevation on TGF- $\beta_1$  expression on the 3rd day, with respect to the control group.

**Key words:** tympanic membrane wound healing, mitomycin C, TGF- $\beta_1$ , bFGF, KGF-1



## GİRİŞ VE AMAÇ

Miringotomi, efüzyonlu otitis media'nın cerrahi tedavisinde uzun yıllardır uygulanmaktadır. Kulak zarında oluşturulan perforasyonun 24-48 saat içinde hızlıca kapanması orta kulak havalanmasının yeterince sağlanmasını engellemektedir.<sup>1,2</sup>

Mitomisin C antibiyotik grubu bir antineoplastiktir. Hücre siklusuna etki ederek protein sentezini bozduğu bilinmektedir. Yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Daha önceki çalışmalarda perforasyon kenarına mitomisin C gibi antiproliferatif ajanların uygulanmasının kapanma süresini uzattığını saptanmıştır.<sup>3,4</sup>

Büyüme faktörleri salınımı yara iyileşmesinin önemli temel basamaklarından biridir. Literatürde timpanik membran yara iyileşmesinde basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), keratinocyte growth factor-1 (KGF-1) gibi bazı büyüme faktörlerinin önemli rol oynadığını gösteren birçok çalışma mevcuttur.<sup>5-12</sup> Mitomisin C' nin büyüme faktörü salınımına etkisini araştıran yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı miringotomi ile oluşturulan perforasyon sonrası mitomisin C uygulanmasının, klinik olarak timpanik membran yara iyileşme süresine ve immünohistokimyasal olarak bFGF, TGF- $\beta_1$ ,KGF-1 salınımlarına olan etkisini ortaya koymaktır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. EFÜZYONLU OTİTİS MEDIA

Efüzyonlu otitis media, orta kulakta akut infeksiyon bulguları olmaksızın sağlam kulak zarı arkasında efüzyon birikimi ile tanımlanır. Üç haftaya kadar süren otit akut, 3 hafta ile 3 ay arası subakut, 3 aydan uzun sürenlere ise kronik efüzyonlu otitis media denmektedir.<sup>13,14</sup>

Sıklıkla akut otitis media sonrası görülse de, en sık neden Östaki tüp disfonksiyonudur.<sup>15</sup> Östaki tüp disfonksiyonunun patofizyolojisinde; basınç regülasyonunun bozulması, kanalın fonksiyonel veya anatomik obstrüksiyonu, konjenital ve kraniofasiyal anomaliler nedeni ile tüpün daha kısa, esnek olması yer almaktadır. Bu nedenlere bağlı olarak mukozal klirens bozulur, nazofarengeal patojenler, gastrik sekresyon ve alerjenlere karşı mukozanın koruyuculuğu azalmaktadır.<sup>16-19</sup>

Otitis media için predispozan faktörler:

- Aile öyküsü varlığı<sup>20</sup>
- Alerji öyküsü<sup>21,22</sup>
- Gastroözafagial reflü<sup>23</sup>
- Rinosinüzit<sup>24</sup>
- Biberon ile beslenme
- Sigara dumanına maruziyet
- Kreş<sup>25</sup>
- Düşük sosyoekonomik düzey
- Kraniofasiyal anomaliler (Down, Crouzon, Apert, Treacher- Collins,

Turner sendromu)

- Yarı damak, kistik fibrozis<sup>16</sup>
- Adenoid vejetasyon

Adenoid vejetasyon varlığı nazofarenkste bakteri kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır. Adenoid'in kitlesel etkisinden çok adenoidit tablosu nedeni ile efüzyonlu otite yol açtığı düşünülmektedir.<sup>26</sup>

Efüzyonlu otitis mediada yapılan çalışmalarda bakteriyel patojenlerin akut otitis media'dakine benzer olduğu görülmüştür. Bu mikroorganizmalar *S.pneumoniae*, *H.influenza*, *M.catarrhalis*' dir.<sup>27,28</sup>

Efüzyonlu otitis media genellikle asemptomatiktir. Semptomatik olduğunda hafif işitme kaybı ile karakterizedir. Okul başarısının düşmesi, davranışsal problemler, konuşma bozukluğu, aile ile iletişimin bozulması işitme kaybının varlığını düşündürmektedir.<sup>16</sup> Yapılan çalışmalarda ortalama 25 dB iletim tipi işitme kaybı olduğu bildirilmiştir. İşitme kaybının yanı sıra kulakta dolgunluk, otalji, vertigo, tinnitus, denge problemleri eşlik edebilirken, muayenede mat, vasküler, retraksiyonun eşlik edebileceği kulak zarı görülmektedir.<sup>29</sup>

Efüzyonlu otitis media çoğu zaman medikal tedavi gerekmeksizin spontan gerilemektedir. Vakaların % 30-40 kadarında rekürren epizodlar görülmektedir. İşitme kaybı, konuşma ve öğrenme bozukluğu olmayan çocuklarda takip ile ilk 3-6 ay içinde efüzyonun gerilediği gözlenmektedir.<sup>30,31</sup>

Medikal tedavide etken mikroorganizmaya yönelik antibiyoterapi, mukolitik, antihistaminik, dekonjestanlar, steroidler kullanılabilir. Önerilen ajanlar arasında amoksisilin, amoksisilin-klavulanik asit, 2. ve 3. kuşak sefalosporinler, makrolidler yer almaktadır.<sup>13,32</sup>

Cerrahi tedavide ise orta kulağın ventilasyonuna yönelik; miringotomi, ventilasyon tüpü takılması, mastoidektomi yapılabilir. Miringotomi ile oluşan perforasyonda efüzyon tam olarak gerilemeden birkaç gün içinde kapanma gerçekleştiği için tek başına yeterli değildir.<sup>33,34</sup>

Efüzyonlu otit gerilemediği takdirde, kalıcı işitme kayıpları, timpanoskleroz, adeziv otitis media, kolesteatom gibi komplikasyonlar gelişebilmektedir.<sup>2,16,32</sup>

Risk faktörü olan çocuklar (Down sendromu, kraniofasiyal anomaliler), timpanik membran retraksiyonları, timpanoskleroz, efüzyon ile ilişkili 40 dB' den fazla iletim tipi işitme kaybı, rekürren akut otit atakları, dil gelişimi, okulda öğrenme başarısının azalması potansiyel ventilasyon tüpü endikasyonlarından biridir.<sup>1</sup>

Ventilasyon tüpleri pars tensanın ön kadranına yerleştirilmektedir. Arka üst kadran kemikçik hasarı yapılabileceğinden tehlikelidir. Arka alt kadran ise orta kulağın latero-medial yönde en dar yeridir. Kolaylıkla promontoryum zedelenebilmektedir. Bu

durumda ciddi vertigo ve total sensörinörial işitme kaybı ortaya çıkabilmektedir. Ventilasyon tüplerinin kalış süresi 2 ay–2 yıl arasında değişmektedir.<sup>1,2</sup>

Ventilasyon tüpüne bağlı komplikasyonlar:

Erken komplikasyonlar:

- Otore
- Tüpün erken atılması
- İşitme kaybı
- Dış kulak yolu travması
- Kanama
- Kemikçik zincir hasarı

Geç komplikasyonlar:

- Timpanik membranda sklerotik değişiklikler
- Kronik süpüratifotitismedia
- Tüp çevresinde granülasyon dokusu
- Tüp içinde polip
- Tıkanma

Tüp atıldıktan sonraki komplikasyonlar:

- Kalıcı perforasyon
- Timpanik membranda atrofi, retraksiyon, timpanoskleroz
- İşitme kaybı
- Kolestomat

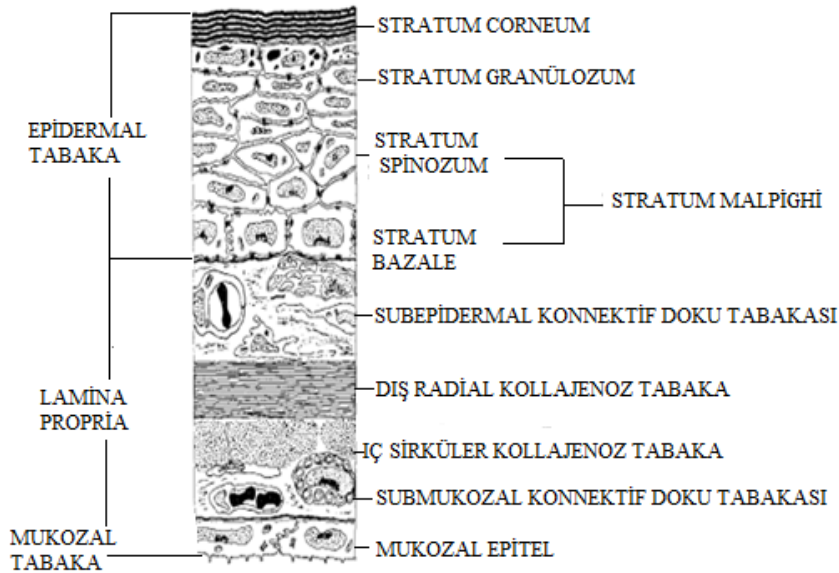
Ventilasyon tüpünün yaratabileceği bu komplikasyonlar nedeni ile efüzyonlu otitis mediada tedavi olarak sadece miringotomi denenmektedir. Fakat miringotominin yarattığı perforasyonlar ise ancak 24-48 saat kadar açık kalabildiği için orta kulak havalanması yeterince sağlanamamaktadır.<sup>1,2,16</sup>

Ventilasyon tüpünün kullanımına bağlı oluşacak komplikasyonları engellemek için miringotomi ile oluşturulan perforasyon süresini uzatmayı hedefleyen birçok çalışma yapılmıştır.<sup>3,4,35,36</sup> Miringotominin tekniği ile ilişkili değişiklikler denenmiştir. En sık kullanılan yöntemler ise radyofrekans ve CO<sub>2</sub> lazer tekniği ile yapılan miringotomilerdir.<sup>35</sup> Yapılan bu çalışmalarla miringotominin tekniğinin perforasyon

süresini etkilediği gösterilmiştir. Sadece teknikte değişikliğe gidilmemiş, perforasyon oluşturduktan sonra lokal olarak mitomisin C, 5-Fluorourasil (5-FU) gibi antiproliferatif ajanlar uygulanarak kapanma süresi daha da uzatılmıştır. Kullanılan ajanların ortak özelliği ise timpanik membran iyileşmesinde gecikmeye neden olmalarıdır.<sup>35,36</sup>

## 2.2. TİMPANİK MEMBRANIN HİSTOLOJİK YAPISI

Kulak zarının pars tensa kısmı üç tabakadan oluşur. Dıştan içe doğru; dış kulak yolu epiteli devamı olan epitel tabaka, lamina propria, orta kulak mukozasının devamı olan epitel tabakadır.<sup>37</sup> Epitelyal tabaka umbodan periferde doğru epitel migrasyonu ile klirensi sağlar. Lamina propria (fibröz tabaka) fibroblastlar, endotel hücreleri, vasküler yapılar, sinirleri ve gevşek bağdokusu içerir. Dışta radial, içte sirküler kollajen liflerden oluşur.<sup>38</sup> İçerdiği ana kollajen tip II kollajendir. Sirküler lifler periferde bulunurken, umboya yakın kısımda sadece radial lifler bulunur. Mukozal tabakanın esas görevi lamina propriayı orta kulaktaki bakterilere, zararlı maddelere, toksinlere karşı korumaktır.<sup>39</sup> Pars tensanın uç kısımlarında fibröz tabaka kalınlaşarak anulus fibrocartilagineus adı verilen halkayı oluşturur. Pars flaksidada fibröz tabaka yoktur, zengin kapiller ağ ve sinirler bulunur.<sup>40,41</sup>



Şekil 1: Timpanik membran epitel tabakalarının şematik görünüm<sup>42</sup>

## 2.4. YARA İYİLEŞMESİ

Yara iyileşmesi inflamasyon, doku formasyonu, doku remodelingi olmak üzere 3 fazdan oluşur.

a) **İnflamasyon:** Doku hasarı sonrası damarlarda ekstrasvazyon gözlenmektedir. Plateletlerin fibrin tıkaç yapışmaları ile birlikte birçok mediatör ve sitokin salınımı başlamaktadır. İnflamasyon evresinde polimorfonükleer lökositler ilk 24-48 saatte baskın olarak rol almakta ve fibrin tıkaç göç etmektedirler. Nötrofillerin görevi yara yerindeki yabancı maddeleri ve bakterileri yok etmektir.<sup>43</sup> Hasardan 3- 5 gün sonra nötrofil yerini makrofaj hakimiyetine bırakmaktadırlar. Makrofajlar, Platelet derived Growth Factor(PDGF), Epidemal Growth Factor(EGF), Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Transforming Growth Factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), basic Fibroblast Growth Factor (basic FGF) gibi birçok büyüme faktörünün salınımdan sorumludur.<sup>44</sup>

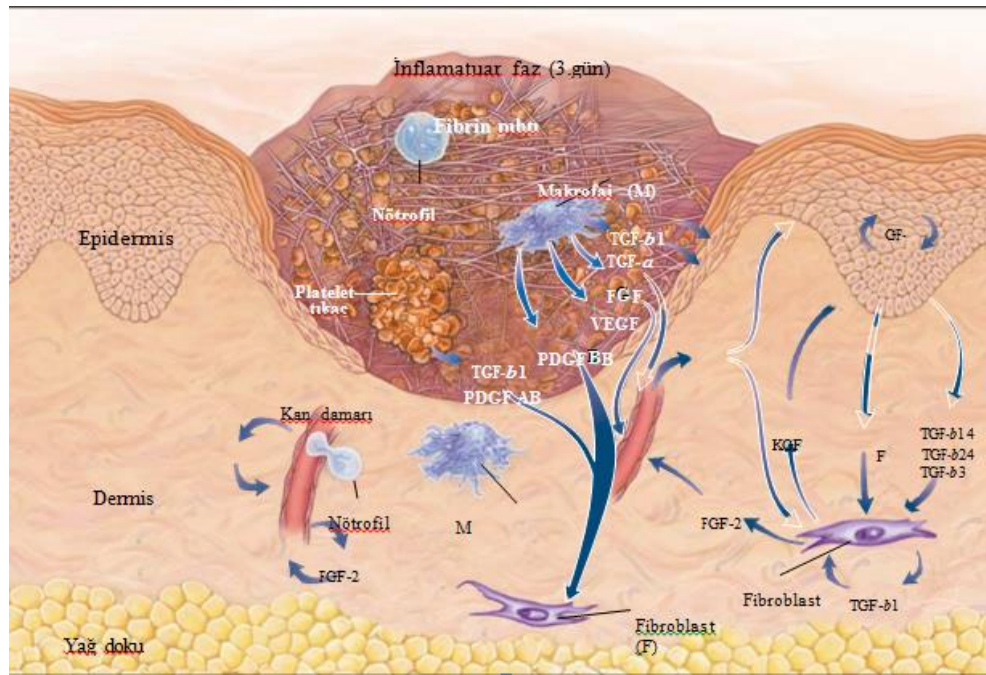
b) **Doku formasyonu:** Hasarlanmadan 4 gün sonra kollajen, hyalüronik asit ve fibronektinden oluşan gevşek ekstraselüler matriks oluşmaktadır. Bu doku içinde çoğunlukla makrofajlar ve fibroblastlar gözlenmektedir.

***Fibrozis;*** fibroblast çoğalması ve ekstraselüler matriks (ESM) oluşumu için gerekli olan kollajen sentezinin olduğu dönemdir. Fibroblastlar yaralanmadan sonra ilk 24 saat içinde mezenkimal hücrelerden gelişmektedir. Glikoprotein, mukopolisakkaritlerden oluşan ekstraselüler matriks oluşumunda rol almaktadırlar. Kollajen oluşumu anjiogenezisini uyarmaktadır. Bu dönemde makrofajlardan salınan bFGF ve TGF- $\beta$  ile stimüle olan fibroblastların çoğalması ve migrasyonu sonucu gevşek bir ekstraselüler matriks oluşmaktadır. Ekstraselüler matriks hücreler arasında dolgu maddesidir, hücrelere mekanik desteği, regülatör moleküllerin depolanmasını ve prezentasyonunu sağlamaktadır. Fibroblastlardan kollajen sentezinin 3-5. günlerde başladığı görülmektedir. Oluşan granülasyon dokusu skar dokusuna dönüşmektedir.<sup>43</sup>

***Anjiogenezis;*** oluşan yeni ekstraselüler matriksin devamlılığı için vaskülarizasyonun artması gerekmektedir. Makrofaj ve endotel hücrelerden salınan FGF, Vasculer endothelial growth factor (VEGF), TGF- $\beta$  gibi faktörler anjiogenezisi stimüle etmektedir.<sup>44</sup> Özellikle yara iyileşmesinin ilk 3 gününde bFGF etkinliği fazladır.

**Epitelizasyon;** epitelizasyonun yaralanmadan saatler sonra başladığı gözlenmektedir. Epitelyal hücreler çoğalarak hasar olan yere doğru göç etmektedir. Yaralanmadan birkaç gün sonra yara kenarındaki epitelyal hücreler çoğalmaya başlamaktadır. Bu olayı başlatan sinyal tam olarak bilinmese de, komşu epitel bölgenin epitel hücresinden yoksun oluşu ve büyüme faktörlerinin artan salınımlarının rol aldığı düşünülmektedir.

- c) **Olgulaşma evresi:** Bu süreçte ekstraselüler matriksin içeriğinin matürasyon arttıkça değiştiği gözlenmektedir. Oluşan ekstraselüler matrikste yıkımdan sorumlu proteinazlar üretilmektedir. Kollajen sentezi ve proteoliz arasındaki denge yarının matürasyonundan sorumludur. Daha önce gevşek olan dokuda gerginlik ve esneklik arttığı gözlenmektedir.<sup>43</sup>



**Şekil 2:** Kutanöz yara iyileşmesinde inflamatuvar faz (3.gün). Epidermal hücrelerin migrasyonu için büyüme hormonlarının salınımı gerekmektedir.<sup>43</sup>

## 2.4.TİMPANİK MEMBRAN YARA İYİLEŞMESİ

Kulak zarı perforasyon iyileşmesi, epitelyal çoğalma, epitelyal migrasyon, fibroblastik aktivite artışı, anjiogenezis ve doku remodeling evrelerinden oluşmaktadır.<sup>45</sup> Diğer yara iyileşmelerinden farklı olarak, dıştaki skuamoz epitelin kulak zarının merkezinden perifer ve dış kulak yoluna doğru devamlı bir migrasyonu söz konusudur.<sup>46</sup>

Timpanik membran iyileşmesinin temel basamaklarından biri reepitelizasyondur. Perforasyondan sonra fibröz tabakada ödem, epitelde nekroz ve perforasyon kenarlarında eksuda oluşmaktadır. Daha sonra ilk 48 saatte epitelizasyon başlamaktadır. Epitelyal çoğalma kanlanmanın fazla olduğu malleus, anulus, dış kulak yolu kanalı gibi yerlerde daha fazladır. Bu çoğalma perforasyonun merkezine doğrudur ve yara üzerinde ekstraselüler matriks yerine köprü oluşmaktadır.<sup>47</sup>

İyi bir yara iyileşmesi için epitelyal migrasyonun ve sonrasında fibroblastların çoğalması ile fibröz tabakanın oluşması gerekmektedir. Bu migrasyon ve keratinizasyonu sağlayan polimorfonükleer hücreler ve makrofajlardan salınan sitokin ve büyüme faktörleridir.<sup>48,49</sup> Bu migrasyon kulak zarının posteriorunda daha fazladır. Normal kulak zarı umbodan başlayan sentrifugal migrasyon ile serumeni dış kulak yoluna doğru temizleyerek atmaktadır. Yara iyileşmesinde ise bu migrasyon sentripedaldir. Perforasyon kenarlarından santrale doğru olmaktadır. Hasarlanmadan sonra inflamatuvar ve hemostaz süreci ilk 48 saatte başlamaktadır.<sup>48</sup> Timpanik membran yara iyileşmesinde ilk iki basamak kutanöz yara iyileşmesi ile benzerdir. Timpanik membran yara iyileşmesinde farklı olarak fibröz tabakadaki göçün epitelizasyondan sonra olmasıdır. Tipik yara iyileşmesinden farklı olarak epitelizasyon ile perforasyondaki açıklığı atlayarak defekt kapanmakta, sonrasında fibroblast aktivasyonu sayesinde oluşan yeni kollajenlerle fibröz komponent gelişmektedir. Süreç içindeki mukozal alanların içeriye doğru uzaması ile devam etmektedir. Bazı perforasyonların kapanmamasında perforasyonların epitelizasyon ile köprü oluşturulamayacak kadar büyük boyutta olmalarının rol aldığı düşünülmektedir.<sup>50</sup>

Özetle diğer dokulardaki yara iyileşmesi timpanik membran yara iyileşmesine inflamasyon ve hemostaz aşamasından benzerken çoğalma ve epitelizasyon evreleri farklıdır.<sup>48</sup> Fibröz tabaka en son göç eden kısım olmakla beraber, bazen bu evre



gerçekleşmeyebilmektedir. Oluşan zar epitel, mukoza ve arasındaki ince bir fibröz tabakadan meydana gelmektedir.<sup>49,51</sup>

## 2.5. RAT KULAK ANATOMİSİ

Rat ve insanlarda kulak anatomisi benzerlikler göstermektedir. Kulak zarının pars flaksida kısmı rölatif olarak pars tensaya göre daha geniştir. Kulak zarında, pars tensanın lamina propria kısmında kollajen fibriller bulunmaktadır. Bunlar dış radial tabaka ve iç sirküler tabakadır. Pars flaksidada ise gevşek kollajen paketleri ve elastik fibriller mevcuttur. Ratların kulak zarları horizontal düzlem ile 20 derecelik açı yapmaktadır. Elips şeklindedir. Uzun eksenini ortalama 6 mm, kısa eksenini ortalama 4 mm uzunluğundadır. Kulak zarı 5 µm kalınlığındadır. Dış yüzü yassı epitel ile döşeli olup, zarın kenarlarında dış kulak yolunun epidermisi ile devam etmektedir. Orta tabakayı oluşturan fibröz lamina propria, anulus fibrosusa doğru uzanarak, timpanik olukta periosta yapışmaktadır. Zarın iç yüzeyini de yassı epitel örtmektedir.<sup>52</sup>

Rat temporal kemik anatomisinde bazı farklılıklar mevcuttur. Timpanik bulla olarak isimlendirilen çok geniş bir ortakulak boşluğuna sahiptir. Timpanik halka, mastoide benzer çıkıntı, petröz parça ve az gelişmiş bir skuamöz parçadan oluşmaktadır. Mastoid havalı hücre sistemi daha basit olup dört büyük hücreden oluşmakta ve insandaki trabekülasyon gözlenmemektedir.<sup>53</sup>

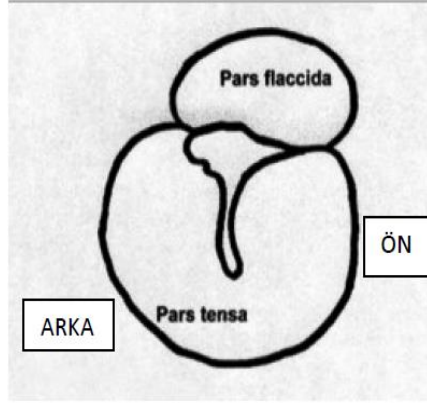
Timpanik kavite epitimpanum, mezotimpanum ve hipotimpanum olarak üç bölüme ayrılmaktadır. Ratlardaki kemikçikler insandaki gibidir, fakat boyut olarak yaklaşık dörtte bir oranında daha küçüktür.<sup>52</sup> Alta ve promontoryumun önünde, timpanik kavite tabanının yukarısında Östaki tüpünün açılış yeri mevcuttur. Östaki tüpünün timpanik kaviteye açıldığı yerde silyalı ve sekretuar psödostratifiye kolumnar epitel mevcuttur. Bu silyalı sekretuar hücreler iç duvar ve promontoryum boyunca, yuvarlak pencere nişinin üst ve arkasına doğru devam etmektedir.<sup>54</sup> Timpanik çıkıntının üzerinde timpanik kavitenin üst arka duvarını oluşturmak üzere pars flaksida ve pars tensa arasındaki bileşkeye uzanmaktadır. Epitimpanumu, kemikçik zinciri ve komşu mukozal katlantıları içeren geri kalan orta kulak kavitesini ise silyasız basit skuamöz-küboidal epitel kaplamaktadır. Subepitelyal tabakada ise damarlar, sinirler, çeşitli sayıda fibroblastlar, mast hücreleri ve makrofajlar yer almakta, gland bulunmamaktadır.<sup>55</sup>

Ratların kokleası, bullada daha belirgin olarak görülmekte ve insanlarda 2.5-2.75 tur dönerken ratlarda 3,25 tur dönüş yapmaktadır.<sup>53</sup>

### Rat ve insan kulak zarı arasındaki farklar:

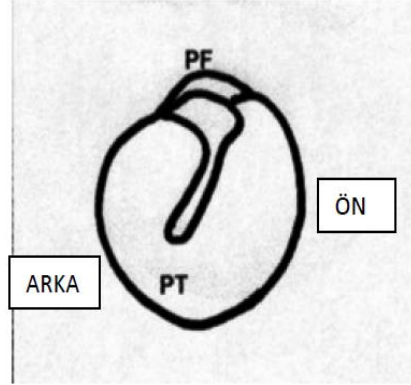
#### Rat kulak zarı

- 1) Pars flaksida pars tensanın %25-29'una eşittir
- 2) Malleusun kısa prosesi arkayı göstermekte
- 3) Kulak zarı ön-arka çapı 2.2-2.4 mm.
- 4) Manubrium mallei yukarıdan aşağıya kavislenerek uzanır .



#### İnsan kulak zarı

- 1) Pars faksida pars tensanın %3-6 'sına eşittir.
- 2) Malleusun kısa prosesi öni göstermekte
- 3) Kulak zarı ön-arka çapı 9-10 mm.
- 4) Manubrium mallei yukarıdan aşağıya uzanırken önden arkaya doğru yönelmektedir.



Şekil 3: Rat ve insan kulak zarı görünümü. (Sağ kulak zarı)<sup>56</sup>

## 2.6. TİMPANİK MEMBRAN YARA İYİLEŞMESİ VE BÜYÜME FAKTÖRLERİ

Timpanik membran perforasyon iyileşmesinde büyüme faktörlerinin rolünü araştıran birçok çalışma mevcuttur. En sık rol alan faktörler arasında FGF2, Keratinocyte growth factor-1 (KGF-1), TGF-  $\beta_1$ , EGF yer almaktadır.<sup>5,8,9,10,11,12</sup>

Yara iyileşmesinin ilk safhalarında hasarlanan dokudaki inflamatuvar hücrelerden büyüme faktörü salınımı başlamaktadır. Bu salınım ile fibroblast migrasyonu, endotel hücre ve vasküler hücrelerde çoğalma artmaktadır. Böylece çoğalma ve onarım fazına geçiş olmaktadır. İnflamatuvar hücreler ilerleyen süreçte düşüş gösterince büyüme faktörleri salınımını fibroblast, endotel hücreleri ve keratinositler devralmaktadır.<sup>6</sup>

**FGF2 (bFGF):** Endotelial hücre çoğalması, keratinosit ve fibroblast proliferasyonunu sağlarken, kemotaksisi stimüle etmektedir. FGF, hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonunu sağlamaktadır.<sup>48</sup> Yapılan bazı çalışmalarda lokal FGF uygulaması sonrasında timpanik membran yara iyileşmesinin hızlandığı görülmüştür.<sup>8,9</sup> FGF2 diğer adı ile bFGF, fibroblast ve endotel hücreleri tarafından salınmaktadır. Vaskülariteyi arttıran en önemli faktörlerden biridir.<sup>7</sup> Yapılan çalışmalarda normal timpanik membranda bFGF rastlanmadığı halde, travmadan sonra zarın hasar alan kısmında özellikle bazal epitel hücreleri ve perisitlerde salınımın arttığı gösterilmiştir. Bu artış travmadan 36 saat sonra başlamakta, 3.günde perforasyon kenarlarında güçlü immünohistokimyasal boyanma ile kendini göstermektedir. Travmadan 5 gün sonra salınım devam ederken, 8. günde tekrar azalmaktadır.<sup>8,9</sup>

**KGF-1:** Fibroblastlardan ve stromal hücrelerden sentezlenmektedir. KGF-1 reseptörü sadece keratinositlerde olduğu için etkisini keratinositler üzerinden göstermektedir. Keratinosit proliferasyonunu stimüle etmekle birlikte epitelial hücreler için kemotaktik ve mitojendir.<sup>7</sup> Timpanik membran perforasyonundan 12 saat sonra salınımı pik yapmakta, 24 saat sonra tekrar düşüş göstermektedir. Diğer bir salınım artışı ise 3.günde olup 6. güne kadar devam etmektedir. KGF salınımı özellikle keratinosit tabakada gözlenmektedir.<sup>10,11</sup>

**TGF-  $\beta_1$ :** Makrofajlardan, keratinositlerden, platelet ve fibroblastlardan salınmaktadır. Özellikle skar oluşumunu stimüle etmektedir. TGF- $\beta_1$  inflamatuvar hücrelerin çoğalmasını, migrasyonunu stimüle ederek yara iyileşmesinde ekstraselüler matriks oluşumunu indüklemektedir. Mezenşimal dokunun oluşumunu sağlarken vaskülariteyi arttırmaktadır.<sup>48</sup> TGF- $\beta_1$  kronik timpanik membran perforasyonunda perforasyon kenarlarında arttığı ve fibrotik skar oluşumunda önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur.<sup>7,48</sup> Yapılan başka bir çalışmada akut travmatik perforasyon sonrası tekrarlayan TGF- $\beta_1$  uygulaması ile perforasyonun daha hızlı bir şekilde kapandığı görülmüştür. Yani TGF- $\beta_1$  kronik perforasyonlarda olduğu kadar akut travmatik timpanik membran perforasyon iyileşmesinde de etkindir.<sup>12</sup>

## 2.7. MİTOMİSİN C

Mitomisin C bir fungus olan *Streptomyces caespitosus* tarafından üretilen antibiyotik grubu antineoplastiktir. Hücre siklusunun geç G1 ve S fazına etki ederek DNA ve RNA replikasyonunu bloke etmekte ve protein sentezini inhibe etmektedir. Fibroblast, epitelyal hücre ve kapiller çoğalmayı önleyerek skar oluşumunu azaltmaktadır.<sup>3,4,57</sup> Skar oluşumunu azaltığı için laringeal stenoz<sup>58</sup>, glokom<sup>59</sup>, dakriyosistorinostomi<sup>60</sup>, koanal atrezi<sup>61</sup>, fonksiyonel endoskopik sinüs cerrahisi<sup>62</sup>, endolenfatik kese cerrahisinde<sup>63</sup> topikal olarak kullanılmaktadır.

Efüzyonlu otit tedavisinde miringotomi sonrasında perforasyon birkaç gün içinde kapanmaktadır. Perforasyon kenarlarına lokal mitomisin C uygulaması sonrası, perforasyon kapanma süresinin uzadığına dair birçok çalışma mevcuttur.<sup>36, 64, 65</sup>

Mitomisin C' nin fibroblast çoğalmasını ve epitel hücre rejenarasyonunu engelleyerek iyileşmeyi geciktirdiği bilinmektedir.<sup>66</sup> Gray ve ark.'nın<sup>67</sup> yaptıkları çalışmada yara yerine topikal mitomisin C uygulamasının ekstraselüler matriks proteinlerinin salınımını azaltarak yara iyileşmesini engellediğinden bahsedilmektedir.

Mitomisin C' nin hava yolunda topikal olarak kullanımının fibrinoz eksudat gelişimine neden olduğu ve bunun sonucunda ani hava yolu obstrüksiyonu geliştiğini bildiren vakalar mevcuttur.<sup>68</sup> Timpanik membrana topikal uygulanmasının ise doza bağlı olarak toksik etkileri bulunmaktadır. Jassir ve ark.'nın<sup>69</sup> yaptıkları çalışmada ratlarda lazer miringotomi sonrasında farklı dozlarda mitomisin C uygulanmış ve perforasyon kapanma süreleri karşılaştırılmıştır. Mitomisin C' nin 0.4 mg/ ml olarak uygulandığı ratlarda kapanma süresinin anlamlı olarak uzadığı, 2 mg/ ml gibi yüksek dozlarda ise kapanma süresinin düşük doz uygulananlara göre daha erken kapandığı görülmüştür. Yüksek doz mitomisin C' nin orta kulakta toksik etkisi sonucu yoğun otoreye neden olduğu bildirilmiştir. Yaptığı başka bir çalışmada ise ratlarda 0,4 mg/ ml mitomisin C' nin miringotomi süresini anlamlı olarak uzattığı ve otoakustik emisyon ile bu dozda ototoksisiteye rastlanmadığı görülmüştür.<sup>70</sup> Çankaya ve ark.'nin<sup>71</sup> yaptıkları çalışmada ise ratlarda miringotomi sonrası tek sefer 0,2 mg/ ml MC uygulamasının iç kulakta hasara neden olmazken, tekrarlayan uygulamalarda hasarın anlamlı olarak fazla olduğu görülmüştür. Naderpour ve ark.'nin<sup>72</sup> yaptıkları çalışmada miringotomi sonrası topikal olarak kullanılan 4mg/ ml mitomisin C' nin kontrol grubuna göre perforasyon



### 3.GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından 20 dişi, 20 erkek toplam 40 Wistar albino cinsi rat üzerinde, Tıp Fakültesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dallarının katkılarıyla, 30 Mart- 4 Mayıs tarihleri arasında yapılmıştır. Cerrahi girişimler, takip süreci ve ötenazi işlemleri Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 31.05.2011 tarihli ve HADYEK 2011/43 sayılı izni alındıktan sonra, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde uygulandı.

Çalışmada; ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen Wistar albino cinsi yetişkin, 40 rat kullanıldı. İntraperitoneal 50 mg/kg ketamin hidroklorür ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid enjeksiyonuyla sağlanan anestezi sonrası yapılan otomikroskopik bakıda bilateral normal kulak zarı ve dış kulak yoluna sahip olduğu görülen 20 dişi, 20 erkek toplam 40 adet rat çalışmaya dahil edildi.

40 rat 5 eşit gruba ayrıldı. Ratların sağ kulakları çalışma, sol kulakları kontrol grubu olarak kabul edildi. İlk gruptaki 8 rat, normal kulak zarını değerlendirmek amacı ile işlem uygulanmadan 0.gün anestezi sonrası sakrifiye edildi. Aynı gün 2, 3, 4 ve 5. gruptaki ratlara intraperitoneal 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Warner Lambert, İstanbul, Türkiye) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, İstanbul, Türkiye) enjeksiyonuyla sağlanan anestezi sonrası uygun pozisyon verilerek, steril set ve cerrahi mikroskop kullanılarak koter ile sağ ve sol kulak zarlarının ön alt kısmına miringotomi yapıldı. (Resim 1-2) Koter miringotomi sonrası 2, 3, 4 ve 5. gruptaki ratların sağ kulaklarına 0.4 mg/ ml mitomisin C (mitomisin C, Kyowa 10 mg, Kyowa Hakko KogyoCo. Ltd, Tokyo, Japonya) emdirilmiş gelfoam 5 dk süre ile, sol kulaklarına salin emdirilmiş gelfoam 5 dk süre ile uygulandı.

Kontrol ve çalışma grubunu oluşturan tüm ratlarda:

a- Otomikroskopik

b- İmmünohistokimyasal değerlendirme yapıldı.

**a) Otomikroskopik değerlendirme:**

Tüm gruplara işlem öncesi kulak zarı muayenesi yapılarak zarların intakt olduğu tespit edildi. Negatif kontrol grubu (1.grup) ratlar işlem uygulanmadan 0.günde sakrifiye edildi. Miringotomi işleminden sonra 2.grup 3.gün, 3.grup 7.gün, 4.grup 14.gün, 5. grup 30. gün sakrifiye edildi. Her seferinde sakrifiye edilecek olan grup da dahil tüm gruplardaki ratların sağ ve solkulaklarındaki perforasyon kapanma durumu mikroskop ile anestezi sonrası değerlendirilerek kaydedildi.



**Resim 1:** Rat timpanik membranına anestezi sonrası koter ile perforasyon uygulaması



**Resim 2:** Rat sağ kulak zarında oluşturulan perforasyonun görünümü

**b) İmmünohistokimyasal değerlendirme:**

İmmünohistokimyasal olarak normal kulak zarı, perforasyon sonrası mitomisin C ve salin uygulanmış kulak zarındaki TGF- $\beta_1$ , bFGF, KGF-1 salınımları karşılaştırıldı. Bu büyüme faktörlerinin salınımının gerçekleştiği fibroblast, epitel hücreleri ve makrofaj boyanmaları 3 dereceli skalaya göre Tablo 1’ de gösterildiği gibi 2 ayrı patoloj tarafından değerlendirildi.

İmmünboyanma derecesi	Boyanan hücre sayısı
Yok (-)	İmmünboyanma yok
+ (hafif)	1-5 adet hücre boyanması
++ (orta)	6-15 adet hücre boyanması
+++ (şiddetli)	16 adet ve üzeri hücre boyanması

**Tablo 1: İmmünohistokimyasal Skorlama:** Makrofaj, epitel hücresi ve fibroblastların büyüme faktörleri açısından immünboyanma derecelerinin değerlendirilmesi

Bu çalışmada streptavidin-biotinperoksidaz metodu ve invitrogen (Cat No: 85-9073) kiti kullanılarak immünohistokimyasal çalışma yapıldı. İmmünohistokimyasal boyamalar için parafin bloklardan alınan 5  $\mu$ m kalınlığındaki kesitler 3-aminopropyltriethoxysilane (APES, Sigma-Aldrich, USA) ile kaplanmış lamalar üzerine alındı. Kesitler, deparafinizasyon ve dehidrasyondan sonra antijenik yapının açığa çıkarılması amacı ile, sitrat buffer solüsyonunda (pH 6.0) mikrodalga (800 watt, 10 dakika) ile işleme tabi tutuldu. Dokulardaki endojen peroksit aktivitesini önlemek için, hidrojen peroksit’in distile sudaki (%3) çözeltisinde 10 dakika bekletildi. Kesitler KGF1, TGF- $\beta_1$  ve FGF2 (bFGF) primer antikoları ile oda ısısında 60 dakika süre ile inkübe edildi. Kesitlerin fosfolü buffer salin solüsyonu (PBS) ile yıkanmalarının ardından kullanılan primer antikora göre biotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dakika



inkübe edildi. Ardından, tüm kesitler fosfolu buffer salin solüsyonu (PBS) ile yıkanarak peroksidaz bağlanmış streptavidin ile 30 dakika inkübe edildi. Doku kesitlerine, renk ortaya çıkarıcı substrat olarak, fosfatlı buffer solüsyonunda çözdürülen 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC; Invitrogen Corporation, Inchinnan Business Park, 3 Fountain Drive Paisley PA4 9RF, UK) kromojen solüsyonu renk değişimi elde edilinceye kadar uygulandı. Arka plan boyaması Lillie Mayers Alum Hematoksilen ile yapıldı. Daha sonra kesitler dehidre edildi, su bazlı immün yapıştırıcı ile kaplanarak ışık mikroskopunda (NikonEclipse E600) değerlendirildi. Negatif kontrollerde primer antikor yerine keçi ya da tavşan serumu uygulandı.

<b>Primer antikor</b>	<b>Dilusyon</b>	<b>Kaynak (Katalog no)</b>	
Polyclonalrabbit anti-TGF- $\beta_1$	1/100	SantaCruzLaboratories, California, USA (sc-146)	SantaCruz,
Polyclonalrabbit anti- KGF1	1/100	Bioss (bs-0734R)	
Polyclonalrabbit anti-FGF2 (bFGF)	1/100	SantaCruzLaboratories, California, USA (sc-79)	SantaCruz,

**Tablo 2:** İmmünohistokimyasal boyamalarda kullanılan primer antikorlar

#### 4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışılan özellikler kategorik verilerle ifade edildiği için, çalışmanın istatistiksel analizi için çapraz tablolar oluşturularak özellikler arası ilişkiler Pearson Chi-Square testi ve beklenen değerlerin 5' den küçük olduğu durumlarda 2x2 lik tablolarda Fisher'in kesin olasılık testi ile kontrol edildi. Verilerde tanımlayıcı istatistik olarak frekans ve yüzde değerler kullanıldı. Tüm analizler SPSS Ver:20 istatistik paket programı ile yapıldı. Testlerde p değeri < 0,05 anlamlı kabul edildi.

## 5. BULGULAR

### **Klinik bulgular:**

Otuz iki ratın 3, 7, 14 ve 30. günlerde sakrifiye edilmeden önce kulak zarlarının otomikroskopik muayenesi yapıldı. Ratların hiçbirinde otore gelişmediği görüldü. Perforasyon kapanma durumları anestezi sonrası kontrol edilerek kaydedildi.

Üçüncü gün 32 rat değerlendirildiğinde salin grubunda 2 kulak zarı perforasyonunun kapandığı gözlenirken, mitomisin C grubunda hiç kapanma olmadığı görüldü. Değerlendirme sonrası 2. grup rat sakrifiye edildi.

Yedinci gün kalan 24 rat değerlendirildiğinde salin grubunda 6, mitomisin C grubunda 1 adet kulak zarı perforasyonunun kapandığı gözlendi. Bu değerlendirme sonrası 3. grup sakrifiye edildi.

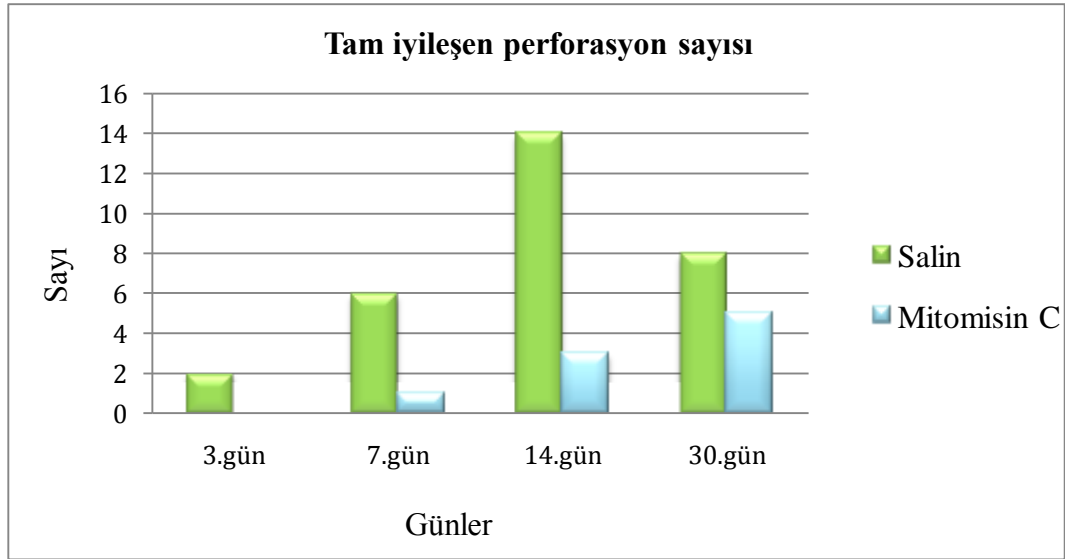
Ondördüncü gün ise kalan 16 rat değerlendirildi. Salin grubunda 14, mitomisin C grubunda 3 kulak zarı perforasyonunun kapandığı kaydedildi. Değerlendirme sonrası 4. grup rat sakrifiye edildi.

Son 8 ratın kaldığı 30. günde salin grubunda 8, mitomisin C grubunda 5 adet kulak zarı perforasyonunun kapandığı gözlendi.

Yedinci ve ondördüncü günlerde tam iyileşen perforasyon sayısının mitomisin C grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak az olduğu görüldü. İki grup arasında bu günler için tam iyileşen perforasyon sayılarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar vardı (**p < 0,05**). Günlere göre tam iyileşen perforasyon sayıları Tablo 3' de verilmiştir.

Günler	Gruplardaki tam iyileşen perforasyon sayısı		p değeri
	Salin	Mitomisin C	
3.gün (n=32)	2/32 (%6.3)	0/32 (%0.0)	>0,05
7.gün (n=24)	6/24 (%25)	1/24 (%3.1)	<b>p=0,035</b>
14.gün (n=16)	14/16 (%87,5)	3/16 (%18,8)	<b>p&lt;0,001</b>
30.gün (n=8)	8/8 (%100)	5/8 (%62,5)	>0,05

**Tablo 3:** Günlere göre gruplardaki tam iyileşen perforasyon sayıları



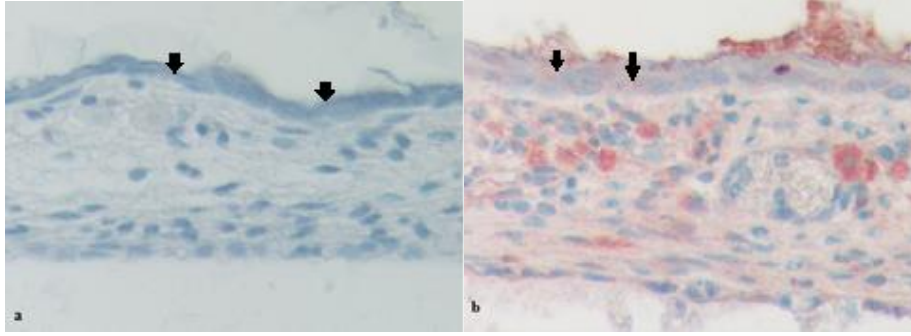
**Grafik 1:** Günlere göre iki gruptaki tam iyileşen perforasyon sayılarının grafiksel görünümü

### **İmmünohistokimyasal sonuçlar:**

Büyüme faktörlerinin immünohistokimyasal olarak boyanmaları değerlendirildiğinde, bu boyanmaların daha çok sitoplazmik olduğu görüldü.

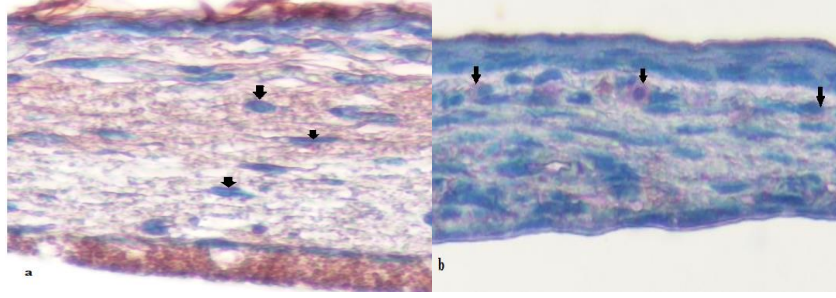
Salin ve mitomisin C grubunda perforasyondan sonra 3, 7, 14 ve 30. günlerde, zar epitelinde, zarda bulunan makrofaj ve fibroblastlarda bFGF, TGF- $\beta_1$ , KGF-1' in immünboyanma pozitiflikleri karşılaştırıldı. Bu büyüme faktörlerinin normal zardaki salınımları da incelendi.

**bFGF' nin** normal kulak zarında zar epitelinde immünboyanma göstermediği, fibroblastlarda ise hafif derecede immünboyanmanın olduğu görüldü. Perforasyondan sonra salin ve mitomisin C grubunda immünohistokimyasal olarak zar epiteli, zarda bulunan makrofaj ve fibroblastlardaki immünboyanmaların arttığı izlendi. Fakat iki gruptaki artış karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark olmadığı gözlemlendi.



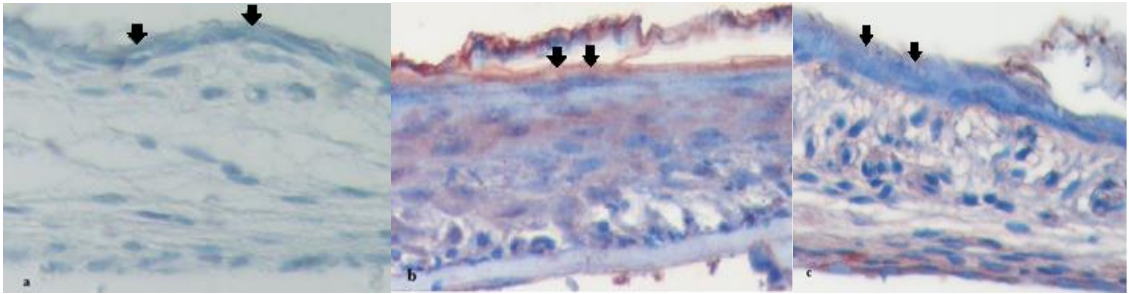
**Resim 3: a)** İmmünohistokimyasal boyama (x 40) ile normal timpanik membranda zar epitelinde (oklar) bFGF salınımı açısından negatifliğin görünümü  
**b)** İmmünohistokimyasal boyama (x 40) ile 3. günde mitomisin C grubunda zar epitelinde (oklar) orta (++) düzeyde immünopozitifliğin görünümü

**TGF- $\beta_1$**  salınımı normal zar epitelinde eser miktardaydı. Normal zar fibroblast ve makrofajlarında ise hafif ve orta derecelerde immünopozitiflikler kaydedildi. İmmünohistokimyasal olarak salin ve MC gruplarındaki boyanmalar değerlendirildiğinde zar epitelinde ve fibroblastlarda anlamlı fark gözlenmedi ( $p > 0,05$ ). Zardaki makrofajlardaki immünopozitiflik açısından iki grup arasında 3. gün anlamlı fark gözlemlendi. Salin grubunda immünboyanma olmazken, mitomisin C grubunda hafif ve orta düzeyde immünboyanma izlendi ( $p < 0,05$ ). Diğer günlerde fark izlenmedi.



**Resim 4: a)** İmmünohistokimyasal boyama (x 40) ile 3. günde salin grubunda timpanik membranda makrofajlarda TGF- $\beta_1$  salınımı açısından boyanma negatifliği (oklar)  
**b)** İmmünohistokimyasal boyama (x 40) ile 3. günde mitomisin C grubunda TGF- $\beta_1$  timpanik membranda makrofajlarda orta (++) düzeyde immünopozitifliğin görünümü (oklar)

**KGF-1** salınımı normal zarda değerlendirildiğinde zar epiteli ve zar fibroblastlarında immünopozitiflik izlenmedi. Zar makrofajlarında ise birkaç adet hafif ve orta derecelerde immünboyanma görüldü. İmmünohistokimyasal olarak salin ve MC grubunda zar epiteli, zardaki makrofaj ve fibroblastlardaki boyanmaları değerlendirildi. Perforasyondan sonra 3. günde salınımın salin ve MC grubunda arttığı, 7. günde devam ettiği, diğer günlerde salınımın olmadığı görüldü. Zar epitelinde, fibroblastlarda, makrofajlarda salınım açısından iki grup arasında anlamlı fark izlenmedi (  $p > 0,05$ ).



**Resim 5: a)** İmmünohistokimyasal boyama (x 40) ile normal timpanik membranda zar epitelinde KGF salınımı açısından negatifliğin görünümü (oklar)

**b)** İmmünohistokimyasal boyama (x 40) ile 3. günde mitomisin C grubunda KGF' nin zar epitelinde (oklar) şiddetli (+++) düzeyde immünopozitifliğin görünümü

**c)** İmmünohistokimyasal boyama (x 40) ile 7. günde mitomisin C grubunda zar epitelinde KGF' nin (oklar) hafif (+) düzeyde immünopozitifliğin görünümü

## İmmünohistokimyasal bulguların istatistiksel analizi:

### **bFGF:**

**bFGF' nin** immünohistokimyasal olarak zar epiteli, zarda bulunan makrofaj ve fibroblastlardaki boyanmaları iki grup için değerlendirildiğinde aralarında anlamlı fark olmadığı gözlemlendi ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 4:** bFGF, 3.gün sonuçları

İmmünboyanma derecesi	Salin	Mitomisin C	p değeri
	n= 8	n =8	
Zar epiteli boyanma			
-	0 (%0)	2 (%25)	
+	4 (%50)	5 (%62,5)	
++	4(%50)	1 (%12,5)	
+++	0 (%0)	0 (%0)	p= 0.141
Zar fibroblast boyanma			
-	1 (%12,5)	1 (%12,5)	
+	2(%25)	5(%62,5)	
++	5(%62,5)	2(%25)	
+++	0 (%0)	0 (%0)	p= 0.276
Zar makrofaj boyanma			
-	5 (%62,5)	1(%12,5)	
+	3(%37,5)	5 (%62,5)	
++	0 (%0)	2 (%25)	
+++	0 (%0)	0 (%0)	p= 0.076

**Tablo 5:** bFGF, 7.gün sonuçları

İmmünboyanma derecesi	Salin	Mitomisin C	p değeri
	n= 8	n =8	
Zar epiteli boyanma			
-	3 (%37,5)	3(%37,5)	
+	3(%37,5)	5(%62,5)	
++	2 (%25)	0 (%0)	
+++	0 (%0)	0 (%0)	p= 0.287
Zar fibroblast boyanma			
-	1 (%12,5)	1 (%12,5)	
+	5 (%62,5)	3 (%37,5)	
++	2 (%25)	2 (%25)	
+++	0 (%0)	2 (%25)	p= 0.475
Zar makrofaj boyanma			
-	2 (%25)	1 (%12,5)	
+	6 (%75)	6 (%75)	
++	0 (%0)	1 (%12,5)	
+++	0 (%0)	0 (%0)	p= 0.513

**Tablo 6:** bFGF, 14.gün sonuçları

İmmünboyanma derecesi	Salin	Mitomisin C	p değeri
	n= 8	n =8	
Zar epiteli boyanma			
-	2 (%25)	0 (%0)	
+	3 (%37,5)	7 (%87,5)	
++	2(%25)	1(%12)	
+++	1(%12,5)	0 (%0)	p= 0.177
Zar fibroblast boyanma			
-	3 (%37,5)	2 (%25)	
+	4 (%50)	4 (%50)	
++	1 (%12,5)	2 (%25)	
+++	0 (%0)	0 (%0)	p= 0.766
Zar makrofaj boyanma			
-	4 (%50)	2 (%25)	
+	3 (%37,5)	3 (%37,5)	
++	1 (%12,5)	3 (%37,5)	
+++	0 (%0)	0 (%0)	p= 0.435

**Tablo 7:** bFGF, 30.gün sonuçları

İmmünboyanma derecesi	Salin	Mitomisin C	p değeri
	n= 8	n =8	
Zar epiteli boyanma			
-	0 (%0)	1 (%12,5)	
+	5 (%62,5)	3(%37,5)	
++	3 (%37,5)	3 (%37,5)	
+++	0 (%0)	1 (%12,5)	p= 0.475
Zar fibroblast boyanma			
-	0 (%0)	2 (%25)	
+	3 (%37,5)	2 (%25)	
++	3 (%37,5)	4 (%50)	
+++	2 (%25)	0 (%0)	p= 0.227
Zar makrofaj boyanma			
-	3(%37,5)	2 (%25)	
+	4 (%50)	2 (%25)	
++	1(%12,5)	4 (%50)	
+++	0 (%0)	0 (%0)	p= 0.264

**TGF- $\beta_1$ :**

TGF- $\beta_1$  salınımı değerlendirilirken, zar epiteli, zarda bulunan fibroblastlar ve makrofajlarda immünboyanma şiddetleri karşılaştırıldı.

3. günde zar makrofajlarında salin grubunda immünboyanma gözlenmezken, mitomisin C grubunda hafif (+) ve orta düzeyde (++) immünpozitiflik salin grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha fazlaydı (**p<0,001**).

Diğer günlerde zar epitelinde, fibroblastlarda ve makrofajlarda iki grup arasında anlamlı fark yoktu (p> 0.05).

14. günde kurban edilen mitomisin C grubuna ait 2 adet ratın hazırlanan preparatlarında, immünohistokimyasal olarak boyanmanın sağlanamaması nedeni ile bu ratlar çalışma dışı bırakıldı ve değerlendirmeye alınmadı.



**Tablo 8:** TGF- $\beta_1$ , 3.gün sonuçları

İmmünboyanma derecesi	Salin	Mitomisin C	p değeri
	n= 8	n =8	
Zar epiteli boyanma			
-	4 (%50)	8 (%100)	
+	3(%37,5)	0 ( %0)	
++	1(%12,5)	0 ( %0)	
+++	0 ( %0)	0 ( %0)	p= 0.069
Zar fibroblast boyanma			
-	4 (%50)	0 (%0)	
+	2 (%25)	4 (%50)	
++	2 (%25)	4 (%50)	
+++	0 (%0)	0 (%0)	p= 0.069
Zar makrofaj boyanma			
-	8 (%100)	0 (%0)	
+	0 (%0)	5(%62,5)	
++	0 (%0)	3(%37,5)	
+++	0 (%0)	0 (%0)	<b>p&lt;0.001</b>

**Tablo 9:**TGF- $\beta_1$ , 7.gün sonuçları

İmmünboyanma derecesi	Salin	Mitomisin C	p değeri
	n= 8	n =8	
Zar epiteli boyanma			
-	3 (%37,5)	3 (%37,5)	
+	2 (%25)	2 (%25)	
++	3 (%37,5)	3 (%37,5)	
+++	0 (%0)	0 (%0)	p= 1,00
Zar fibroblast boyanma			
-	2 (%25)	0 (%0)	
+	3 (%37,5)	2 (%25)	
++	3 (%37,5)	6 (%75)	
+++	0 (%0)	0 (%0)	p= 0.202
Zar makrofaj boyanma			
-	7 (%87,5)	7 (%87,5)	
+	0 (%0)	1 (%12,5)	
++	1 (%12,5)	0 (%0)	
+++	0 (%0)	0 (%0)	p= 0.368

**Tablo 10:** TGF- $\beta_1$ , 14.gün sonuçları

İmmünboyanma derecesi	Salin	Mitomisin C	p değeri
	n= 8	n =6	
Zar epiteli boyanma			
-	0(%0)	2(%33,3)	
+	8 (%100)	2(%33,3)	
++	0(%0)	1(%16,7)	
+++	0(%0)	1(%16,7)	p = 0.58
Zar fibroblast boyanma			
-	0(%0)	2(%33,3)	
+	4(%50)	2(%33,3)	
++	4(%50)	2(%33,3)	
+++	0(%0)	0(%0)	p= 0.221
Zar makrofaj boyanma			
-	7(%87,5)	5(%83,3)	
+	1(%12,5)	1(%16,7)	
++	0(%0)	0(%0)	
+++	0(%0)	0(%0)	p= 0.352

**Tablo 11:** TGF- $\beta_1$ , 30.gün sonuçları

İmmünboyanma derecesi	Salin	Mitomisin C	p değeri
	n= 8	n =8	
Zar epiteli boyanma			
-	0 (%0)	2 (%25)	
+	3 (%37,5)	1 (%12,5)	
++	4 (%50)	4 (%50)	
+++	1 (%12,5)	1 (%12,5)	p= 0.392
Zar fibroblast boyanma			
-	3 (%37,5)	1 (%12,5)	
+	2 (%25)	4 (%50)	
++	3 (%37,5)	3 (%37,5)	
+++	0 (%0)	0 (%0)	p= 0.435
Zar makrofaj boyanma			
-	8 (%100)	7 (%87,5)	
+	0 (%0)	1 (%12,5)	
++	0 (%0)	0 (%0)	
+++	0 (%0)	0 (%0)	p= 0.392

**KGF-1:** Salin, mitomisin C grubu arasında günlere göre zar epiteli, fibroblast, makrofaj immüno pozitifliğini değerlendirerek karşılaştırma yapıldı. 3, 7, 14 ve 30. günlerde istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p < 0,05$ ).

Negatif kontrol grubundan 4 adet, 30. günde sakrifiye edilen mitomisin C grubuna ait 1 adet ratın preperatlarında immünohistokimyasal olarak boyanma sağlanamadığı için bu ratlar çalışma dışı bırakıldı.

**Tablo 12:** KGF-1, 3.gün sonuçları

İmmünboyanma derecesi	Salin	Mitomisin C	p değeri
	n= 8	n =8	
<b>Zar epiteli boyanma</b>			
-	2 (%25)	2 (%25)	
+	4 (%50)	0 (%0)	
++	1 (%12,5)	1(%12,5)	
+++	1 (%12,5)	5 (%62,5)	p= 0.083
<b>Zar fibroblast boyanma</b>			
-	4 (%50)	8 (%100)	
+	1 (%12,5)	0 (%0)	
++	1 (%12,5)	0 (%0)	
+++	2 (%25)	0(%0)	p= 0.149
<b>Zar makrofaj boyanma</b>			
-	8 (%100)	4 (%50)	
+	0 (%0)	1 (%12,5)	
++	0(%0)	2 (%25)	
+++	0(%0)	1 (%12,5)	p= 0.149

**Tablo 13:** KGF-1, 7.gün sonuçları

İmmünboyanma derecesi	Salin	Mitomisin C	p değeri
	n= 8	n =8	
Zar epiteli boyanma			
-	1 (%12,5)	0 (%0)	
+	4 (%50)	2 (%25)	
++	2 (%25)	3 (%37,5)	
+++	1 (%12,5)	3 (%37,5)	p= 0.413
Zar fibroblast boyanma			
-	8 (%100)	4 (%50)	
+	0 (%0)	1(%12,5)	
++	0(%0)	3(%37,5)	
+++	0(%0)	0 (%0)	p= 0.069
Zar makrofaj boyanma			
-	8 (%100)	8 (%100)	
+	0 (%0)	0 (%0)	
++	0(%0)	0(%0)	
+++	0(%0)	0 (%0)	p> 0.05

**Tablo 14:** KGF-1, 14.gün sonuçları

İmmünboyanma derecesi	Salin	Mitomisin C	p değeri
	n= 8	n =8	
Zar epiteli boyanma			
-	4 (%50)	5 (%62,5)	
+	3 (%37,5)	0 (%0)	
++	0 (%0)	2 (%25)	
+++	1(%12,5)	1 (%12,5)	p= 0.164
Zar fibroblast boyanma			
-	7 (%87,5)	2 (%25)	
+	0 (%0)	3 (%37,5)	
++	0 (%0)	1 (%12,5)	
+++	1(%12,5)	2 (%25)	p= 0.068
Zar makrofaj boyanma			
-	4 (%50)	6 (%75)	
+	4 (%50)	2 (%25)	
++	0 (%0)	0 (%0)	
+++	0 (%0)	0(%0)	p= 0.302

**Tablo 15:** KGF-1, 30.gün sonuçları

İmmünboyanma derecesi	Salin	Mitomisin C	p değeri
	n= 8	n =7	
Zar epiteli boyanma			
-	8 (%100)	4 (%57,1)	
+	0 (%0)	1 (%14,3)	
++	0 (%0)	0 (%0)	
+++	0 (%0)	2 (%28,6)	p= 0.117
Zar fibroblast boyanma			
-	8 (%100)	5 (%71,4)	
+	0 (%0)	1 (%14,3)	
++	0 (%0)	1(%14,3)	
+++	0 (%0)	0 (%0)	p= 0.267
Zar makrofaj boyanma			
-	8 (%100)	4(%57,1)	
+	0 (%0)	3(%42,9)	
++	0(%0)	0(%0)	
+++	0(%0)	0(%0)	p= 0.077

## 6. TARTIŞMA

Efüzyonlu otitis media vakalarının çoğu spontan gerilediği için tedavide birinci basamak yakın hasta izlemidir. İşitme kaybı, konuşma bozukluğu gibi risk faktörü olmayan hastalarda ilk üç ay medikal tedavi vermeksizin hasta takibi yapılabilir. Orta kulağın havalanmasını sağlamak amacı ile en sık uygulanan cerrahi girişim miringotomidir.<sup>1,16</sup>

Miringotomi ilk kez 19. Yüzyılda Sir Astley Cooper tarafından yapılmıştır. İlk kez ventilasyon tüpü takılması ise 1867' de Politzer tarafından denenmiştir. Uzun yıllar miringotomi ve miringotomi ile birlikte ventilasyon tüpü takılmasının birbirlerine üstünlükleri tartışılmıştır. Ventilasyon tüpünün yol açtığı komplikasyonlar nedeni ile zamanla tüp takılma endikasyonları giderek daraltılmıştır.<sup>74</sup>

Per Caye-Thomassen ve ark.'nın<sup>75</sup> yaptıkları çalışmada 224 efüzyonlu otitis medialis hastaya bilateral miringotomi ve sağ kulaklarına ventilasyon tüpü uygulanmıştır. 25 yıllık takipte miringosklerozun ve timpanik membranda atrofinin tüp uygulanan tarafta daha sık, retraksiyonun ise tüp takılmayan kulakta daha fazla olduğu görülmüştür. İşitmede elde edilen kazanç ise, tüp takılanlarda tüpün yerinde olduğu süre içinde daha fazla gibi görünse de, uzun dönemde tedavi sonrası iki grup arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Bu çalışmada uzun dönemde ventilasyon tüpü uygulamasının Östaki tüp disfonksiyonun seyrinde rol oynamadığı ve takiplerde tüp takılmasına bağlı timpanik membranda patolojik değişiklikler geliştiği görülmüştür.

Miringotomi ile oluşan perforasyon tek başına uygulandığında birkaç gün içinde hızlı bir şekilde kapanmaktadır.<sup>74</sup> Orta kulak havalanmasını amaçlayan, perforasyon kapanma süresini uzatan birçok teknik kullanılmıştır. Ventilasyon tüpünün komplikasyonlarından kaçınmak için farklı tekniklerle sadece miringotomi ya da miringotomi sonrası antineoplastik ajanların lokal uygulanması ile perforasyon kapanma süresi uzatılmaya çalışılmıştır.<sup>35,36</sup>

Literatürde lazer ve radyofrekans miringotomi ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır.<sup>35,76,77,78,79</sup> Yapılan bu çalışmalarda lazer miringotomi ile oluşturulan perforasyonun miringotomi ile oluşturulan perforasyona göre daha uzun sürede kapandığı gösterilmiştir. Szeremeta ve ark.'nın<sup>76</sup> yaptıkları çalışmada miringotomi ve CO<sub>2</sub> lazer miringotomi karşılaştırılmıştır. Lazer miringotomide perforasyon

kapanma süresi anlamlı olarak uzun bulunurken, rekürren efüzyon gelişimi açısından takiplerde iki grup arasında fark görülmemiştir.

Mitomisin C' nin topikal kullanımı ile akut travmatik timpanik membran perforasyonlarının kapanma süresini uzattığı bilinmektedir. Bu etkisini hücre siklusuna etki ederek protein sentezini bozarak göstermektedir. Ayrıca fibroblast çoğalmasını engelleyip fibrozis oluşumunu azaltmakta ve ekstraselüler matriks oluşumunu da olumsuz yönde etkilemektedir.<sup>3,66,67</sup>

Lachanas ve ark.'nın<sup>35</sup> yaptıkları çalışmada 20 adet tavşana bilateral radyofrekans miringotomi sonrası sol kulaklarına salin, sağ kulaklarına 0.3 mg/ ml MC uygulanmıştır. MC uygulanan kulakta ortalama perforasyon kapanma süresi 5.45 hafta, kontrol grubunda ise 1.60 hafta olarak kaydedilmiştir. MC grubunda perforasyon kapanma süresi anlamlı olarak uzun bulunmuştur.

Lachanas ve ark.'nın<sup>79</sup> yaptıkları başka bir çalışmada 40 ratın yarısına bilateral CO<sub>2</sub> lazer, yarısına bilateral radyofrekans miringotomi yaptıktan sonra tüm ratların sol kulaklarına salin, sağ kulaklarına 0.3 mg/ ml MC uygulanmıştır. Perforasyon kapanma süresi değerlendirildiğinde lazer ve radyofrekans teknikleri arasında fark gözlenmezken, MC uygulanan kulaklarda ortalama perforasyon kapanma süresinin anlamlı olarak uzadığı görülmüştür.

Yücel ve ark.'nın<sup>64</sup> yaptığı çalışmada ise 40 adet rata bilateral CO<sub>2</sub> lazer miringotomi yapıldıktan sonra, sol kulaklarına salin, sağ kulakların yarısına 2.0 mg/ ml MC, yarısına 1.0 mg / ml MC uygulanmışlardır. MC grubunda perforasyon kapanma süresinin anlamlı olarak daha uzun olduğu görülmüştür.

Baylançiçek ve ark.'nın yaptığı<sup>65</sup> yaptığı çalışmada 40 adet rata bilateral radyofrekans ile miringotomi yapıldıktan sonra sol kulaklarına salin, sağ kulaklarının yarısına MC, yarısına 5-Fluorourasil ( 5-FU) uygulanmıştır. Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında MC ve 5- FU grubunda ortalama perforasyon kapanma süresi anlamlı olarak uzamışken, bu iki grup arasında fark bildirilmemiştir.

Bu çalışmada, günlere göre tam iyileşen perforasyon sayıları karşılaştırıldı. MC grubundaki perforasyonlarda 7 ve 14. günler gibi ilerleyen günlerde salin grubuna göre anlamlı derecede daha az sayıda tam iyileşme olduğu görüldü. MC uygulamasının literatürle uyumlu olarak kontrol grubuna göre özellikle ilerleyen günlerde perforasyon kapanma süresini uzattığı görüldü. MC grubunda 3. günde perforasyonlarda kapanma

gözlenmedi. Salin grubunda ise 2 adet perforasyonda kapanma mevcuttu. Perforasyonlar genellikle 2. günden sonra iyileşmeye başladığı için salin grubunda kapanma miktarı azdı. Bu nedenle iki grup arasında anlamlı fark elde edilemediği düşünüldü.

Yapılan çalışmalarda kulak zarı perforasyonlarının iyileşme sürecinde büyüme faktörlerinin önemli rol oynadığı öne sürülmüştür. Büyüme faktörü salınımı yara iyileşmesinin temel basamaklarından biridir.<sup>6,9,10,11</sup> Bu faktörler yara iyileşmesi sırasında inflamatuvar fazda inflamatuvar hücreler tarafından sentezlenip ortama salınmaktadır. Büyüme faktörlerinin salınımı ile fibroblast, epitel hücreler, vasküler endotel hücrelerin migrasyonu ve çoğalması artmaktadır. Böylece çoğalma ve onarım fazı başlamaktadır. İnflamatuvar hücreler ortamda azalırken bu faktörlerin salınımını fibroblast, keratinositler ve endotel hücreleri üstlenmektedir. Çoğalmanın devamını sağlayan büyüme faktörleri ekstraselüler matriks oluşumunu ve kapiller formasyonu arttırmaktadır. Remodeling fazında ise dengeli bir skar formasyonu oluşumu için kollajenaz ve proteazlarla birlikte rol almaktadır.<sup>6</sup> Bu büyüme faktörlerinin yara iyileşmesini hızlandırdığına dair birçok çalışma bulunmaktadır.<sup>9,12,80</sup> Bu çalışmalarda hasarlı bölgeye lokal uygulanmaları sonrası yara iyileşme sürecinin hızlandığı bildirilmiştir.

Mondain ve ark.'nın<sup>8</sup> yaptıkları çalışmada ratlarda travmatik kulak zarı perforasyonu sonrasında kulak zarının normal kısmında bFGF' ye rastlanmadığı bildirilmiştir. Perforasyon kenarlarında ise perisit ve polimorfonükleer hücreler etrafında yoğun olmak üzere 36. saatte hafif immunopozitiflik saptanırken, 3. günde güçlü immunopozitiflik kaydedildi. Boyanmanın 5 ve 8. günlerde bazal epitel hücreler etrafında yoğunlaştığı görülmüştür.

Bu çalışmada bFGF normal kulak zarında zar epitelinde rastlanmadı. Zardaki fibroblastlarda ise hafif derecede immunopozitiflik saptandı. Perforasyon sonrası her iki grupta da salınımının benzer oranlarda artış gösterdiği izlendi. bFGF salınımına normal zarda rastlanmazken perforasyon sonrasında artması, yara iyileşmesinde rol alan büyüme faktörlerinden biri olduğunu düşündürmektedir. Mitomisin C' nin bFGF salınımı üzerine kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark yaratan etkisi görülmemiştir.



Somers ve ark.'nın<sup>48</sup> yaptıkları çalışmada kadavra kaynaklı normal timpanik membrandan ve miringoplasti sırasında 1 yıldır perfore kulak zarından örnek alınıp immünohistokimyasal olarak büyüme faktörü dağılımlarını karşılaştırılmıştır. bFGF yoğun olarak üst epitel tabakada sitoplazmik immünboyanma göstermiş, stromal boyanma ise yama tarzında daha az görülmüştür. Stromal boyanmanın nedeni ise fibroblast ve inflamatuvar hücrelerden olan salınımın olduğu belirtilmiştir. Vasküler duvar boyanma ve intralüminal boyanmada oldukça yoğun olduğu görülmüştür. Normal kulak zarı ve kronik perforasyon arasında dağılımda farklılık gözlenmemiştir. TGF- $\beta_1$  ise vasküler boyanma her iki grupta fazla ve benzerken, normal timpanik membranda subepitelyal tabaka ve fibröz tabakada hiç immünboyanma görülmemiştir. Perfore kulakta ise bu alanlarda yoğun immünboyanma kaydedilmiştir. TGF- $\beta_1$  salınımının özellikle fibroplazinin derecesi ilişkili olduğu ve kronik perforasyonlarda perforasyon kenarında subepitelyal skar oluşumunda önemli rol oynadığını vurgulamışlardır.

Bu çalışmada TGF- $\beta_1$  salınımı yapılan çalışmalarla uyumlu olarak normal zar epitelinde eser miktarda izlendi. Zar fibroblast ve makrofajlarında ise normal zarda da hafif ve orta derecelerde immunpozitiflikler kaydedildi. Perforasyon sonrası zar epitelinde salin ve mitomisin C grubunda TGF- $\beta_1$ salınımının arttığı görüldü. Mitomisin C grubunda 3. günde zar makrofajlarında TGF- $\beta_1$ salınımı kontrol grubuna göre fazlaydı. TGF- $\beta_1$  salınımının artması antiproliferatif ajan uygulaması sonrasında gelişen bir otostimülasyon olabileceği düşünüldü.

Santa Maria ve ark.'nın<sup>10</sup> yaptıkları çalışmada ratlar miringotomi sonrası 12, 24 ve 36. saatlerde ve 2' den 14. güne kadar sakrifiye edilerek immünohistokimyasal olarak KGF-1, bFGF salınımları incelenmiştir. Normal timpanik membranda bFGF salınımına rastanmamıştır. Miringotomi sonrası 12. saatte hafif olarak perforasyonun malleus tarafında keratinosit tabakada arttığı, 3 ve 5. günlerde bu salınımın pik yaptığı saptanmıştır. 8 ve 9. günlerde konnektif doku tabakasında salınımın daha fazla olduğu, 14.günde ise normal timpanik membran seviyesine gerilediği kaydedilmiştir. KGF-1'in travmadan sonra 12. saatte ve 3. günde konnektif doku ve keratinosit tabakada pik yaptığı, salınımın 6. güne kadar devam ettiği ve 7. günde azalmaya başladığı görülmüştür.

Ishibashi ve ark.'nın<sup>81</sup> yaptıkları çalışmada 35 adet rat, uygulanan bilateral miringotomi işlemi sonrasında 24. saat, 3 ve 7. günlerde sakrifiye edilmiş, timpanik

membranlarının normal kısımları da çıkarılarak spesimende değerlendirilmeye alınmıştır. PCR yöntemi ile KGF, bFGF salınımları iyileşmekte olan zarda ve normal zarda değerlendirilmiştir. İyileşme sürecinde olan zarda bu büyüme faktörlerinin salınımlarının arttığı görülmüştür. İlk 24 saatte normal zara göre KGF salınımının 2.1 kat, 3. günde ise 3.6 kat fazla salındığı, 7. günde ise salınımının düşüş gösterdiği belirtilmiştir. bFGF' nin ise tam tersine 3. günde pik yaptığı, 7. günde salınımının devam ettiği görülmüştür.

KGF fibroblast ve stromal hücreler tarafından salınmaktadır. Fakat KGF reseptörü (KGFR) sadece keratinositlerde olduğu için hedef organ keratinositlerdir. KGF' nin stromal hücrelerden salınıp epitelyal hücre migrasyon ve çoğalmasını etkilemesi stromal doku ve epitel doku arasındaki etkileşimde önemli rol oynadığını düşündürmektedir.<sup>82</sup>

Bu çalışmada KGF-1 salınımı normal zarda değerlendirildiğinde zar epiteli ve zar fibroblastlarında immünpozitiflik izlenmedi. Zar makrofajlarında ise eser düzeyde immünboyanma görüldü. Perforasyondan sonra kontrol ve MC grubunda salınımın benzer oranlarda arttığı saptandı. KGF-1 salınımı her iki grupta da özellikle 3. günde belirgindi. İlerleyen günlerde salınımların çok az olduğu görüldü. Diğer çalışmalarla uyumlu olarak KGF-1 salınımının yara iyileşmesinin epitelyal hiperplazi gibi keratinosit çoğalmasının yoğun olduğu erken dönemlerinde rol aldığı düşünüldü. Bu çalışmada mitomisin C' nin KGF-1 salınımını üzerine kontrol grubuna göre, anlamlı fark yaratan etkisinin olmadığı görülmüştür.

Literatürde normal timpanik membran ve akut perforasyon sonrası timpanik membrandaki büyüme faktörü salınımları belirlenerek, büyüme faktörlerinin yara iyileşmesindeki rolünü araştıran birçok çalışma bulunmaktadır.<sup>8,10,11,48</sup> Fakat MC' nin büyüme faktörü salınımı üzerine etkisini araştıran çok fazla yayın bulunmamaktadır.

Occleston ve ark.'nın<sup>83</sup> yaptıkları çalışmada invitro olarak insan gözü tenon kapsülü hücrelerine salin ve MC ( 0,001, 0,01 ve 0,1 mg/ ml ) uygulaması sonrası fibroblast çoğalması, TGF-  $\beta_1$  ve bFGF salınımları incelenmiştir. Salin grubunda büyüme faktörlerinin salınımlarının 48 gün içinde giderek azaldığını, MC grubunda ise başlangıçta arttığını 48 gün içinde giderek azalarak kontrol grubu ile aynı veya biraz daha yüksek seviyelerde kaldığını bulmuşlardır. Literatüre bakıldığında büyüme faktörleri salınımı hipoksi<sup>84</sup>, doku hasarı<sup>85</sup>, iyonize radyasyon maruziyeti<sup>86</sup> sonrasında

artmaktadır. Bu çalışmada, başlangıçtaki artışın nedeninin antiproliferatif uygulamaya bağlı oluşan selüler hasar ve bu faktörlerin otostimülasyon yeteneğinin olabileceği vurgulanmıştır. Aynı çalışmada fibroblastların çoğalmasının MC uygulananı ile inhibe olduğu gösterilmiştir.

Chen ve ark.'nın<sup>87</sup> yaptıkları çalışmada invitro olarak normal dermal fibroblastlara 0.4 mg/ ml 4 dk süreyle MC uygulanmıştır. TGF-  $\beta_1$  ve bFGF salınımlarının 0, 1, 3 ve 5. günlerde salın uygulanan kontrol grubuna göre arttığı belirtilmiştir.

Bu çalışmada miringotomi sonrası MC uygulamasının otomikroskopik olarak timpanik membran yara iyileşmesini kontrol grubuna göre geciktirdiği saptanmış, fakat her iki grup arasında bFGF ve KGF-1 salınımlarının benzer olduğu görülmüştür. TGF-  $\beta_1$ salınımlarının MC grubunda artmış olması ise MC' nin antiproliferatif etkisine karşı gelişen bir otostimülasyon olarak değerlendirilmiştir.

## 7. SONUÇLAR

- 1) Ratlarda miringotomi sonrası perforasyon kenarına 5 dk süreyle 0.4 mg MC uygulaması sonrası, günlere göre yapılan değerlendirmede ilerleyen günlerde kulak zarı perfore olan rat sayısının MC grubunda anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü.
- 2) İmmünohistokimyasal boyanmalar sonucunda normal zarda bFGF, TGF- $\beta_1$ , KGF-1 salınımlarının yok veya çok az olduğu, perforasyondan sonra bu faktörlerin salınımlarının arttığı görüldü.
- 3) Bu çalışmada mitomisin C' nin bFGF ve KGF-1 salınımı üzerine kontrol grubuna göre anlamlı fark yaratan etkisinin olmadığı görüldü. TGF- $\beta_1$  salınımının ise 3. günde MC grubunda kontrol grubuna göre fazla olduğu saptandı. TGF- $\beta_1$  salınımının MC grubunda artmış olması ise MC' nin antiproliferatif etkisine karşı gelişen bir otostimülasyon olarak değerlendirilmiştir.

## 8.KAYNAKLAR

- 1) American Academy of Family Physicians, American Academy of Otolaryngology Head and Neck Surgery, American Academy of Pediatrics Subcommittee on Otitis Media With Effusion. Otitis media eith effusion. Pediatrics. 2004; 113: 1412
- 2) Çelik O. Kulak burun boğaz hastalıkları ve baş boyun cerrahisi, Cilt 2. Asya Tıp Kitapevi. 2. Baskı 2007 s: 140-150.
- 3) O' reill RC, Steven A. Goldman SA, Widner S, Cass SP. Creating a stable tympanic membrane perforation using mitomycin C. Otolaryngol Head Neck Surg 2001; 124: 40-5.
- 4) Kang SG, Chung H, Yoo YD, Lee JG, Choi YI, Yu YS. Mechanism of growth inhibitory effect of Mitomycin-C on cultured human retinal pigment epithelial cells: apoptosis and cell cycle arrest. Curr Eye Res. 2001 Mar; 22(3): 174-81.
- 5) Ma Y, Zhao H et al. Topical treatment with growth factors forty tympanic membrane perforations: progress towards clinical application. Acta Otolaryngol 2002; 122(6):586–599.
- 6) Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing. Part II. Role in normal and chronic wound healing. Am J Surg 1993; 166: 74-81.
- 7) Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Canic MT. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Rep Reg. 2008; 16: 585-601.
- 8) Mondain M, Ryan A. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor are induced in guinea-pig tympanic membrane following traumatic perforation. Acta Otolaryngol 1995;115: 50-4.
- 9) Hakuba N, Iwanaga M, Tanaka S, Hiratsuka Y, Kumabe Y, Konishi M, Okanoue Y, Hiwatashi N, Wada T. Basic fibroblast growth factor combined with atelocollagen for closing chronic tympanic membrane perforations in 87 patients. Otology Neurotol. 2009; 31: 118-121.
- 10) Santa Maria PL, Redmond SL, Atlas MD. Keratinocyte growth factor 1, fibroblast growth factor 2 and 10 in the healing tympanic membrane following perforation in rats. J Mol Histol 2011; 42: 47–58.
- 11) Ishimoto SI, IShibashi T, Bottaro DP, Kaga K. Direct application of keratinocyte growth factor, basic fibroblast growth factor and Transforming Growth Factor-  $\alpha$  during

healing of tympanic membrane perforation in glucocorticoid-treated rats. *Acta Otolaryngol* 2002; 122: 468–473.

12) Kaftan H, Herzog M, Mieke B, Hosemann W. Topical application of transforming growth factor-  $\beta_1$  in acutetraumatic tympanic membrane perforations: an experimental study in rats. *Wound Rep Reg*. 2006; 14: 453-456.

13) Paparella, MM, Schachern, P, New developments in treating otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl*.1994 May; 163: 7-10.

14) Rosenfeld MR, Culpepper L, Doyle KJ, Grundfast KM. Clinical practice guideline: Otitis media with effusion. *Otolaryngol Head and Neck Surg*. 2004 May; 130: 95-115.

15) Leach AJ, Morris PS. The burden and outcome of respiratory tract infection in Australian and aboriginal children. *Pediatr Infect Dis J*. 2007; 26: S4.

16) Akyıldız AN, Kulak hastalıkları ve mikroşirurjisi, Cilt 1. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara. 1998 s: 22-62, 275-300.

17) Bluestone CD, Klein JO. Otitis media and Eustachian tube dysfunction. In: Bluestone CD, Sylven SE, Alper CM, et al. *Pediatric Otolaryngology*. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 2003; s: 474.

18) Bylander A, Tjernström O, Ivarsson A. Pressure opening and closing functions of the Eustachian tube by inflation and deflation in children and adults with normal ears. *Acta Otolaryngol* 1983; 96: 255.

19) Licameli GR. The Eustachian tube. Update anatomy, development, and function. *Otolaryngol Clin North Am*. 2002; 35: 803.

20) Teele DW, Klein JO, Rosner BA. Epidemiology of otitis media in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol Supply*. 1980; 89: 5.

21) Alles R, Parikh A, Hawk L, et al. The prevalence of atopic disorders in children with chronic otitis media with effusion. *Pediatr Allergy Immunol*. 2001; 12: 102.

22) Hurst DS, Amin K, Seveus L, Venge P. Mast cells and typtase in the middle er of children with otitis media with effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1999; 49(Supply 1): S315.

23) Miura MS, Mascaro M, Rosenfeld RM. Association between otitis media and gastroesophageal reflux: a systematic rewiev. *Otolaryngol Head and Neck Surg*. 2012; 146: 345.

- 24) Casselbrant ML, Brostoff LM, Cantekin El, et al. Otitis media with effusion in preschool children. *Laryngoscope*. 1985; 95: 428.
- 25) Owen MJ, Baldwin CD, Swank PR, et al. Relation of infant feeding practices, cigarette smoke exposure, and group child care to the onset and duration of otitis media with effusion in the first two years of life. *J Pediatr*. 1993; 123: 702.
- 26) Watanabe T, Fujiyoshi T, Tomonaga K, Mogi G. Adenoids and otitis media with effusion in children, *Clinical oriented updata, Otorhinolaryngol Basel Karger*. 1992; 47: 232-240.
- 27) Poetker DM, Lindstrom DR, Edmiston CE, et al. Microbiology of middle ear effusions from 292 patients undergoing tympanostomy tube placement for middle ear disease. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2005; 69: 799.
- 28) Bluestone CD, Stephenson JS, Martin LM. Ten years review of otitis media pathogens. *Pediatr Infect Dis*. 1992; 11: 7.
- 29) Fria TJ, Cantekin El, Eichler JA. Hearing acuity of children with otitis media with effusion. *Arch Otolaryngol*. 1985; 111: 10.
- 30) Tos M. Epidemiology and natural history of secretory otitis. *Am J Otol*. 1984; 5: 459.
- 31) Rosenfeld RM, Kay D. Natural history of untreated otitis media. *Laryngoscope*. 2003; 113: 1645.
- 32) Berman S, Casselbrant ML, Chonmaitree T, Giebink GS, Grote JJ, Ingvarsson LB, et al. Recent advances in otitis media. 9. Treatment, complications, and sequelae. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 2002; 188: 102-24.
- 33) Mandel EM, Rockette HE, Bluestone CD, et al. Myringotomy with and without tympanostomy tubes for chronic otitis media with effusion. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1989; 115: 1217.
- 34) Mandel EM, Rockette HE, Bluestone CD, et al. Efficacy of myringotomy with and without tympanostomy tubes for chronic otitis media with effusion. *Pediatr Infect Dis J*. 1992; 11: 270.
- 35) Lachanas VA, Prokopakis EP, Malandrakis SG, Hajjiioannou JK, Christodoulou PN, Velegrakis GA. Radiofrequency myringotomy with the topical use of mitomycin C: an experimental study. *Otol Neurotol*. 2006; 27: 4-7.

- 36) Cincik H, Güngör A, Çekin E, Sağlam Ö, Yildirim Ş. Effects of Topical Application of Mitomycin-C and 5-Fluorouracil on Myringotomy in Rats. *Otol Neurotol*. 2005; 26: 351–354.
- 37) Yamashita T. Histology of the tympanic perforation and the replacement membrane. *Acta Otolaryngol* 1985; 100(1-2): 66-71.
- 38) Yeo SW, Kim SW, Suh BD, et al. Effect of platelet-derived growth factor- AA on the healing process of tympanic membrane perforation. *Am J Otolaryngol* 2000; 21(3): 153-160.
- 39) Heine PA, Anatomy of the Ear. *Vet Clin Small Anim*. 2004; 34: 379-395.
- 40) Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 2004; 9: 283.
- 41) Puria et al. Multiphoton Microscopy Imaging of Collagen Fiber Layers and Orientation in the Tympanic Membrane, *ProcOfSPIE*. 2008; 2842: 1-7.
- 42) Lim DJ. Structure and function of the tympanic membrane: A review. *Acta otorhinolaryngol Belg*. 1995; 49:101-115.
- 43) Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999 Sep 2; 341(10): 738-46.
- 44) Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, Babilas P. Oxygen in acute and chronic wound healing. *The British Journal of Dermatology* 2010; 163(2): 257-268.
- 45) Johnson A, Hawke M. The function of migratory epidermis in the healing of tympanic membrane and external ear canal of the guinea pig. *J Otolaryngol* 1985; 14(6) : 357-364.
- 46) Johnson AP, Smallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. A Two- dimensional histological study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 1990; 109(5-6): 406-415.
- 47) Govaerts PJ, Jacob WA, Marquet J. Histological study of the thin replacement membrane of human tympanic membrane perforation. *Acta Otolaryngol* 1988; 105(3-4): 297-302.
- 48) Somers T, Goovaerts G, Schelfhout L, Peeters S, Govaerts PJ, Offeciers E. Growth factors in tympanic membrane perforation. *Am J Otol* 1998; 19: 428-34.



- 49) Hellström S, Laurent C. Hyaluronan and healing of tympanic membrane perforations. An experimental study. *Acta Otolaryngol Suppl* 1987; 442: 54-61.
- 50) Gallstone H, Jackler R, Varav K. Tympanic Membrane Wound Healing. *Otolaryngol Clin North Am.* 1995; 28(5):913-932.
- 51) Johnson A, Hawke M. An ultrastructural study of skin of the tympanic membrane external ear canal of the guinea pigs. *J Otolaryngol* 1985; 14(6): 357-364.
- 52) Hebel R, Stromberg M. *Anatomy of the laboratory rat*, Baltimore. The Williams and Wilkins Co. 1976; s: 145-152.
- 53) Judkins RF, Li H. Surgical anatomy of the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997; 117: 438-447.
- 54) Albiin N, Hellström S, Stenfors LE, Cerne A. Middle ear mucosa in rats and humans. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.* 1986 Sep- Oct; 126: 2-15.
- 55) Sichel JY, Plotnik M, Cherny L, Sohmer H, Elidan J. Surgical anatomy of the ear of the fat sand rat. *J Otolaryngol.* 1999 Aug; 28(4):217-22.
- 56) Castagno LA, Lavinsky L. Tympanic membrane healing in myringotomies performed with argon laser or microknife: an experimental study in rats. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006 Nov- Dec; 72(6): 794-9.
- 57) Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 1.Cilt. 1994; s:1047.
- 58) Warner D, Brietzke SE. Mitomycin C and airway surgery: How well does it work? *Otolaryngol Head and Neck Surg* 2008; 138: 700-709.
- 59) Magevand GS, Salmon JF, Scholtz RP, Murray AD. The effect of reducing the exposure time of mitomycin C in glaucoma filtering surgery. *Ophthalmology.* 1995; 102: 84-90.
- 60) Beloglazov VG, Grusha OV, Saad-El'din NM, At'kova E, Malaeva LV. The prevention and treatment of recurrences after dacryorhinostomies. *Vest. Oftalmol.* 1999; 115: 14-17.
- 61) Prasad M, Ward RF, April MM, Bent JP, Froehlich P. Topical Mitomycin as an Adjunct to Choanal Atresia Repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128(4):398-400.
- 62) Chung JH, Cosenza MJ, Rahbar R, Metson RB. Mitomycin C for the prevention of adhesion formation after endoscopic sinus surgery: A randomized, controlled study. *Otolaryngol Head and Neck Surg.* 2002; 126(5): 468-474.

- 63) Yazawa Y, Suzuki M, Kitano H, Kitajima K. Intraoperative mitomycin C in endolymphatic sac surgery for Meniere's disease: A pilot study, *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 1999; 61 (4): 188–194.
- 64) Yücel OT. Topical use of mitomycin C in laser myringotomy: an experimental study in rats. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2000; 54: 93–6.
- 65) Baylançecek S, Sarı M, Tutkun A. Effect of topical use of mitomycin C and 5-fluorouracil on the closure time of myringotomies created by radiofrequency unit. *Acta OtoLaryngol.* 2009; 129: 1212-1216.
- 66) Janga CH, Songb CH, Pakc SC. Effect of exposure to mitomycin C on cultured tympanic membrane fibroblasts. *Int Journal of Pediatr Otorhinolaryngol.* 2003; 67: 173-176.
- 67) Gray SD, Tritle N, Li W. The effect of mitomycin on extracellular matrix proteins in a rat wound model. *Laryngoscope.* 2003 Feb; 113(2):237-42.
- 68) Hueman EM, Simpson CB, Antonio S. Airway Complications from Topical Mitomycin C. *Otolaryngol Head and Neck Surg.* 2005; 133: 831-835.
- 69) Jassir D, Odabaşı O, Marin OG, Buchman CA. Dose-response relationship of topically applied mitomycin C for the prevention of laser myringotomy closure. *Otolaryngol Head and Neck Surg.* 2003; 129(5): 471-474.
- 70) Jassir D, Odabaşı O, Marin OG. Safety and efficacy of topical mitomycin C in myringotomy patency *Otolaryngol Head and Neck Surg.* 2001 Apr; 124(4): 368-73.
- 71) Çankaya H, Egeli E, Kuntsal L, Özbek H, İçli M. Effect of topical mitomycin on inner ear: A light and electron microscopic study. *Tohoku J. Exp. Med.* 2002; 197(2): 81-86.
- 72) NaderPour M, Moghaddam YJ, Peirovifar A, Mollajavadi R, Abbasi MM, Mohajeri D. Microscopic comparison of topical use of Mitomycin C and Fluorouracil on cold knife myringotomy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2012 Jan; 76(1): 9-13.
- 73) Mao Y, Varoglu M, Sherman DH. Molecular characterization and analysis of the biosynthetic cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from the *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. *Chemistry and Biology.* 1999; 6: 251–263.
- 74) Mandel EM, Rockette HE, Bluestone CD, Paradise JL, Nozza JN. Myringotomy with and without tympanostomy tubes for chronic otitis media with effusion. *Arch Otolaryngol Head and Neck Surg.* 1989; 115: 1217-1224.

- 75) Thomasen PC, Stangerup SE, Jorgensen G, Drozdziwicz D, Bonding P, Tos M. Myringotomy Versus Ventilation Tubes in Secretory Otitis Media: Eardrum Pathology, Hearing, and Eustachian Tube Function 25 Years After Treatment. *Otol Neurotol*. 2008; 29: 649-657.
- 76) Szeremeta W, Parameswaran MS, Isaacson G. Adenoidectomy with laser or incisional myringotomy for otitis media with effusion, *Laryngoscope*. 2000; 110: 342-345.
- 77) Soderberg O, Hellstrom S, Stenfors LE. Myringotomy made by CO2 laser - an alternative to ventilation tubes? An experimental study. *Acta Otolaryngol*. 1984 (Stockh.); 97: 335-341
- 78) Çınar F, Uğur MB, Uzun L. Could radiofrequency myringotomy be an alternative to incisional myringotomy? *Int Journal of Pediatr Otorhinolaryngol*. 2008; 72: 1493-1496.
- 79) Lachanas VA, Prokopakis EP, Christodoulou PN, Hajjioannou JK, Malandrakis SG, Karatzanis AD, Velegrakis GA. Comparative study of laser versus radiofrequency myringotomy in rabbits: The effectiveness of mitomycin C application. *Otol Neurotol*. 2006; 27: 1162-5.
- 80) Özkaptan Y, Gerek M, Simsek S, 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):S2-S5.
- 81) Ishibashi T, Shinogami M, Ishimoto SI, Yoshida K, Kaga K. Induction of KGF, basic FGF, and TGFalpha mRNA expression during healing of experimental TM perforations. *Acta Otolaryngol* 1998;118(5):701-704.
- 82) Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*. 1996; 271: 1592-7.
- 83) Occleston N, Daniels JT, Tarnuzzer RW. Single exposures to antiproliferatives long term effects on ocular fibroblast wound healing behavior. *Invest Ophth Vis Sci*, 1997 Sep; 38(10): 1998-2007.
- 84) T. Sakaki, K. Yamada, H. Otsuki, T. Yuguchi, E. Kohmura, T. Hayakawa. Brief exposure to hypoxia induces bFGF mRNA and protein and protects rat cortical neurons from prolonged hypoxic stress. *Neurosci Res*. 1995; 23; 289-296.

- 85) Winkle LS, Isaac JM, Plopper CG. Distribution of epidermal growth factor receptor and ligands during bronchiolar epithelial repair from naphthalene-induced Clara cell injury in the Mouse. *Am J Pathol.* 1997; 151: 443–459.
- 86) Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, Erdos G, Gupta AK, Ways DK. Effect of ionizing radiation on AP-1 binding activity and basic fibroblast growth factor gene expression in drug-sensitive human breast carcinoma MCF-7 and multidrug-resistant MCF-7/ADR cells. *J Biol Chem.* 1995; 270: 28790–28796.
- 87) Chen T, Shaun S, Kunnavatana BA, Koch RJ. Effects of Mitomycin-C on Normal Dermal Fibroblasts. *Laryngoscope.* 2006; 116: 514–517.