

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

DENEYSEL AKUT TRAVMATİK TİMPANİK MEMBRAN PERFORASYONUNDA
HYALURONİK ASİT, EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ VE MİTOMİSİN C
UYGULAMALARININ KAPANMA SÜRESİ VE HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLERE
OLAN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

103160

UZMANLIK TEZİ

DR. SELMA TEKİN

103160

TEZ DANIŞMANI

DOÇ.DR ENİS ALPİN GÜNERİ

İZMİR-2001

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

1. Giriş	1
2. Gereç ve Yöntem	4
3. Sonuçlar	10
4. Tartışma	18
5. Sonuç	28
6. Özet	29
7. Kaynaklar	32

1. GİRİŞ

Timpanik membran perforasyonu enfeksiyon ve travma sonucunda meydana gelir. Akut timpanik membran perforasyonlarının %90' ı, özellikle de zar yüzeyinin dörtte birinden az bir alanı kaplıyorsa spontan olarak kapanır (1-4). Timpanik membran yüzeyinin kapanmayı önleyecek kadar geniş bir kısmını tutan ya da bir orta kulak patolojisinin eşlik ettiği perforasyonlarda tedavi amacıyla çeşitli greftlerin kullanıldığı mikrocerrahi yöntemlerine başvurulmaktadır. Akut travma sonucu oluşan perforasyonda kenarları birleştirmek ve kenarların mukozal yüze dönmesini engelleyerek iyileşmeyi sağlamak amacıyla vektör materyal uygulaması da kullanılmaktadır. Kapanmayan perforasyonlarda dıştaki epitel tabakası medial yüze dönerek mukozal kat ile birleşmektedir. Perforasyon kenarlarında kapanmayı önleyen bu epitelin ortadan kaldırılması ve fibröz tabakada fibroblastik reaksiyonun tetiklenmesi amacıyla %10'luk triklor asetik asit ile koterizasyon sonucu, pars tensada %65' ten daha az alan kaplayan perforasyonlarda %80' lere varan kapanma oranları bildirilmiştir (5).

Alternatif olarak %1'lik Hyaluronik Asit ve Epidermal Büyüme Faktörü' nün (EBF) topikal uygulanmasının, travmatik timpanik membran perforasyonunun kapanmasını hızlandırdığını gösteren yayınlar da yapılmıştır (15,16,17,18,22,23,24,25).

Travmatik perforasyonun iyileşme süreci oldukça iyi dokümanite edilmiştir. Travmadan sonra perforasyon kenarlarında öncelikle doku sıvısı, lenf ve/veya kandan oluşan ani bir eksudasyon oluşur. Kurut adı verilen bu tabaka alttaki dokuyu korur ve dehidratasyonu önler, ayrıca hücre migrasyonu ve iyileşme süreci için de ideal bir ortam oluşturur. İki gün içerisinde perforasyon kenarlarında aşırı keratin üretimiyle birlikte timpanik membranın dıştaki squamöz epitel katında belirgin bir proliferasyon

gözlenir. İyileşme sürecinin yönünü belirleyen etken, oluşan keratinin perforasyon merkezine doğru itilmesidir. Hiperplastik squamöz epitel polimorfonükleer lökositlerle infiltrate granülasyon dokusu üzerinde yer aldığından defektin kapanması ilk olarak keratin aracılığıyla olur. Takiben squamöz epitel hücreleri birleşir ve daha sonra da destek bağ dokusu ile perforasyon kapanır. Mukozal tabaka perforasyon kapanma sürecinde minimal öneme sahiptir (2-7).

Hyaluronik Asit tüm konnektif dokularda matriks bileşeni olarak bulunan yüksek molekül ağırlıklı bir polisakkarittir (8). Deneysel timpanik membran perforasyonlarında eksojen olarak uygulanan Hyaluronan (Hyaluronik Asit' in sodyum tuzu, Pharmacia AB, Upsala, Sweden) ile iyileşme sürecinin hızlandığı gösterilmiştir (16-19). Hyaluronanın bu etkiyi hangi mekanizma ile sağladığı bilinmemekle birlikte iyileşme sürecinde önemli rol oynayan epitelyal proliferasyon, migrasyon ve artan keratin için bir destek görevi yaptığı düşünülmektedir. Ayrıca keratin yapımını stimüle ettiği, polimorfonükleer lokositler için kemotaktik özellikleri olduğu da gösterilmiştir (16,20).

EBF 53 amino asitli, tek zincirli bir polipeptittir. İlk olarak fare submandibular glandından izole edilmiş, daha sonra rekombinan DNA teknolojisiyle üretilmiştir (9). İn vivo ve invitro çalışmalarda EBF' nün epidermal hücre proliferasyonunu ve keratinizasyonu stimüle ettiği, kültüre fibroblastlar için mitojenik aktivite gösterdiği, eksojen uygulamada yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir (10,11,21) . İki kat epitel arasında yer alan bir fibröz tabakadan oluşan timpanik membranın EBF etkilerini gözlemek açısından uygun bir yapıda olduğu düşünülmektedir. O'Daniel ve ark. (1990) timpanik membranda EBF reseptörleri olduğunu göstermiş ve topikal uygulanan EBF' nün perforasyon kapanmasında yararlı olduğunu belirtmiştir (22).

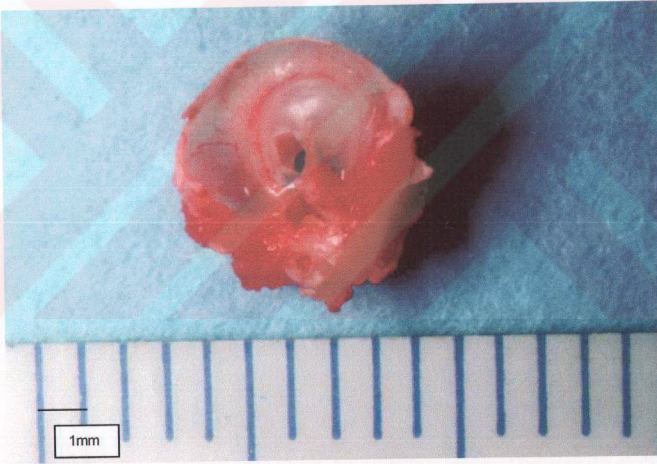
Mitomisin C, *Streptomyces caespitosus*' tan elde edilen alkilleyici bir antineoplastik antibiyotiktir (12). DNA sentezini inhibe etmesinin yanısıra, yüksek konsantrasyonlarda RNA ve protein sentezini de suprese eder. Epitel proliferasyonunu, fibroblast replikasyonunu ve kollajen sentezini inhibe ederek yara iyileşmesini modüle etmede yararlıdır ve oftalmolojik cerrahide glokomlu hastalarda trabekülektomi alanının kapanmasını önlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (29,30). Rat timpanik membranında yapılan çalışmalarda Mitomisin C uygulamasının miringotomi kapanma sürecini uzattığı gösterilmiştir (26-28).

Bu çalışmada Hyaluronik Asit, EBF ve bunlara zıt etki gösterdiği bilinen Mitomisin C' nin deneysel timpanik membran perforasyonu üzerine olan etkilerinin, klinik olarak perforasyon kapanma süresinin gözlenmesinin yanısıra histolojik olarak timpanik membran kalınlığı, fibroblastik reaksiyon, neovaskülarizasyon, epitel kalınlığı, keratin kalınlığı ve kurut alanı kriterleri incelenerek araştırılması planlanmıştır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Laboratuvarında üretilen ortalama 300 gram ağırlığında erkek ratlar çalışmaya alındı. Operasyon mikroskopu ile otoskopik bakıda normal olduğu görülen timpanik membrana sahip 30 hayvan her grupta 10 tane olacak şekilde 3 gruba ayrıldı (A,B,C).

Herbir hayvanda intraperitoneal ketamin hidroklorid (40mg/kg) ve xylazin hidroklorid (5mg/ kg) enjeksiyonuyla anesteziyi takiben akkor hale getirilmiş pik ucu ile bilateral, arka üst kadranda, perforasyon çapı mikroskop okülerine yerleştirilen mikrometre ile kontrol edilerek, 1 mm çapında timpanik membran perforasyonu oluşturuldu.



Resim1.Histopatolojik inceleme için hazırlanan timpanik membran preparatı.

Arka üst kadrandaki perforasyon.

A grubunda tanımlanan standartlarda oluşturulan bilateral perforasyon sonrasında her bir hayvanın sağ kulağında 10 mikrolitre %1 Hyaluronan (%1 Healon, Pharmacia AB, Upsala, Sweden) emdirilmiş 1-1.5mm çapında gelfoam perforasyon üzerine yerleştirildi. İyileşme sürecinde farklı dönemlerde incelemek amacıyla 3., 5., 7., 9. Ve 14. günlerde bir hayvan olmak üzere toplam 5 hayvan intraperitoneal Pentobarbital (80 mg/kg) enjeksiyonunu takiben dekapite edildi. Bilateral dış kulak yolu kemik – kırıkardak bileşkesinden kesilerek ayrıldı. Bulla açıldıktan sonra timpanik membran direk görüş altına alınarak kemik anulus ve 1-2 milimetre dış kulak yolu ile birlikte çıkarıldı ve her iki kulaktan hazırlanan spesmenler %10' luk formaldehit solusyonuna konularak histolojik inceleme için ayrıldı (Resim 1). Diğer 5 hayvan ise perforasyon kapanma sürelerinin saptanması için periyodik günlük otomikroskopik bakı yapılarak izlendi. Hayvanlar sakrifiye edilinceye ya da perforasyonları kapanıncaya kadar sağ kulaklarına günlük Hyaluronan uygulamasına devam edildi.

B grubunda aynı yöntemle oluşturulan bilateral timpanik membran perforasyonunu takiben sağ tarafta 400 Mikrogram/ml; 10 mikrolitre EBF (EGF, Sigma-E9644, Missouri, USA) emdirilmiş 1-1.5 mm çapında gelfoam perforasyon üzerine yerleştirildi. Beş hayvanda sırasıyla 3., 5., 7., 9. ve 14. günlerde sakrifiye edilinceye ve diğer 5 hayvanda da perforasyon kapanıncaya kadar sağ tarafa günlük EBF uygulaması sürdürüldü. Sakrifikasyonu takiben sağ ve sol kulaklar için A grubu ile aynı şekilde hazırlanan spesmenler histolojik inceleme için ayrıldı. Beş hayvan ise bilateral günlük otomikroskopik bakı ile izlenerek perforasyon kapanma süreleri belirlendi.

C grubunda bilateral perforasyonu takiben sağ taraftaki perforasyon üzeri 2mg/ml 10 mikrolitre Mitomisin C emdirilmiş, 1-1.5 mm çapında gelfoam ile yalnız bir kez olmak

üzere, ilk gün kaplandı. Sol tarafa bu grupta herhangi bir uygulama yapılmadı. Beş hayvan 3., 5., 7., 9. ve 14. günlerde sakrifiye edilerek bilateral timpanik membranları histolojik inceleme için hazırlandı. Kalan beş hayvan perforasyon kapanma süresinin saptanması amacıyla 2 ay süresince günlük otomikroskopik bakı ile izlendi.

Her üç gruptaki tüm ratlara enfeksiyon profilaksisi için ilk 5 gün gūnaşırı intramuskuler 150mg/kg ampisilin uygulaması yapıldı.

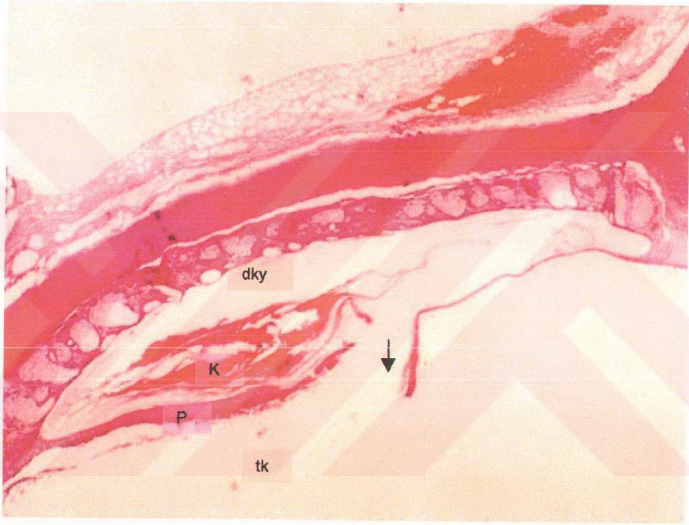
Histopatolojik inceleme için, her üç gruptan alınan 30 adet (5 tane Hyaluronan uygulanan, 5 tane EBF uygulanan, 5 tane Mitomisin C uygulanan ve 15 tane ilaç uygulaması yapılmayan) timpanik membran preparatı formol fiksasyonu sonrası 9 saat dekalsifikasyon amacıyla formik asitte tutulduktan sonra operasyon mikroskopi görüşü altında manubrium mallei' ye dik doğrultuda perforasyon alanından geçecek şekilde ikiye ayrıldı. Her iki parça kesit yüzü üzerine yatırılarak parafin blokları hazırlandı. Daha sonra 5 mikrometre kalınlığında doku kesitleri alınarak hematoksilen eozinle boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi.

Mikroskopik görüntü 100' lük büyütmede bir VCD kamera yardımıyla televizyon ekranına yansıtıldı. Ekrandaki büyütme oranının belirlenmesi amacıyla bir Toma lamı kullanıldı. Lamdaki 0,05 mm uzaklığın ekranda 1cm (10mm)' ye denk geldiği hesaplandı. Böylelikle monitör ve mikroskopi sisteminin $10/0.05=200$ kat büyütme sağladığı belirlendi. Daha sonra ekran görüntüsünden bir cetvel yardımıyla perforasyon kenarının 1-2cm (50-100 mikrometre) yakınında ölçüm yapılarak (Resim 2,3,4) timpanik membranın total kalınlığı, keratin kalınlığı, epitel tabaka kalınlığı ölçüldü ve

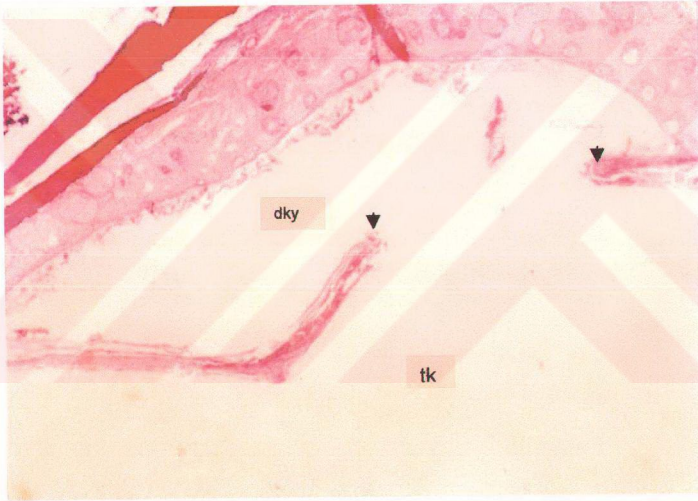
fibröz tabaka semikantitatif olarak değerlendirildi. Ayrıca kurut yapısının düzensiz şekilde olması göz önüne alınarak kurut dağılım alanında nokta sayımı yapıldı.



Resim 2.Timpanik membran perforasyon alanı. (dky: Dış kulak yolu, tk :Timpanik kavite, M: Malleus, F: Fibröz tabaka, K :Kurut alanı) (40X)



Resim 3. Kapanmış timpanik membran perforasyonu (Ok: kesit alınma esnasında malleusun ayrılmış olduğu yer, dky: dış kulak yolu, tk: Timpanik kavite K: kurut, P: Rejenere olan timpanik membran alanı. (20X)



Resim4.Kapanmayan timpanik membran.perforasyon kenarlarında herhangi bir reperatif olay izlenmiyor. Ok: Perforasyon kenarları, dky: Dış kulak yolu, tk: Timpanik kavite) (20X)

3. SONUÇLAR

Tablo 1. Perforasyon kapanma süresi (gün)

No	HA uygulanan (A grubu)	EBF uygulanan (B grubu)	MİT uygulanan (C grubu)	Kontrol A	Kontrol B	Kontrol C
1	11	7	-	14	11	14
2	9	5	-	14	17	14
3	7	9	-	14	11	14
4	7	9	-	17	11	23
5	9	7	-	17	17	17
Ortalama	8.6±1.6	7.4±1.6	Kapanma gözlenmedi	15±1.6	13.4±3	16±3.9

(HA:Hyaluronik asit, EBF: Epidermal Büyüme Faktörü, MİT:Mitomisin C)

A, B ve C gruplarının homojenliğini test etmek için öncelikle her üç kontrol grubunun kapanma süreleri Kruskal-Wallis tek yönlü Anova testi (KW) ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p=0.421$). Buna göre ratlarda timpanik membran perforasyonu spontan iyileşme süresi ortalama 15 ± 2 gün olarak belirlendi.

Mitomisin C uygulanan beş perforasyonda 2 ay boyunca kapanma gözlenmedi .

HA ile EBF uygulanan timpanik membranlardaki perforasyonların kapanma sürelerini karşılaştırmada Mann –Whitney U testi (MWU) uygulandı; her iki grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.3160$).

HA ve EBF gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması Wilcoxon Matched -Pairs Signed -Rank testi (WMP) ile yapıldı. HA veya EBF uygulaması ile timpanik membran perforasyonu kapanma süresinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde kısaldığı belirlendi ($p=0.0432$).

Tablo 2. Timpanik membran kalınlığı (mikrometre)

Gün	HA uygulanan (A grubu)	EBF uygulanan (B grubu)	MİT uygulanan (C grubu)	Kontrol A	Kontrol B	Kontrol C
3.gün	27.5	12.5	17.5	10	17.5	25
5.gün	12.5	20	25	20	17.5	20
7.gün	7.5	20	25	42.5	25	20
9. gün	7.5	45	30	20	35	25
14. gün	5	12.5	20	10	10	25
Ortalama	12±9	22±1,3	23±4,8	20±1,3	21±9	23±2.7

(HA: Hyaluronik asit, EBF:Epidermal Büyüme Faktörü, MİT: Mitomisin C)

A, B ve C gruplarında öncelikle her üç kontrol grubundaki timpanik membran kalınlıkları arasındaki farklılığı incelemek için KW testi kullanıldı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.4844$). Buna göre ratlarda ortalama timpanik membran kalınlığının 22 ± 4 mikrometre olduğu belirlendi.

Her üç grupta uygulama yapılan ve kontrilateral kontrol kulaklar timpanik membran kalınlığı açısından WMP testi ile karşılaştırıldığında;HA ile kontrol A arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız ($p=0.3452$), EBF ile kontrol B arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız ($p=0.8927$), Mitomisin C ile kontrol C arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız ($p=0.1000$) bulundu.

HA, EBF ve Mitomisin C uygulanan gruplar arasında timpanik membran kalınlığı açısından karşılaştırma KW testi ile yapıldı ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.1098$).

Tablo3. Fibroblastik reaksiyon

Gün	HA uygulanan (A grubu)	EBF uygulanan (B grubu)	MiT uygulanan (C grubu)	Kontrol A	Kontrol B	Kontrol C
3.gün	+	+	-	+	-	+
5.gün	+	-	+	+	+	+
7.gün	+	+	++	+	++	++
9.gün	-	+++	+++	-	++	+
14.gün	++	+	+++	+	-	+
Ortalama	1±0.7	1.2±1.09	2±1	0.8±0.44	1±1	1.2±0.44

(HA:Hyaluronik asit, EBF:Epidermal Büyüme Faktörü, MiT:Mitomisin C)

Fibroblastik reaksiyon açısından A, B ve C grupları arasındaki farklılığı test etmek için, öncelikle her üç kontrol grubunun değerleri KW testi ile karşılaştırıldı. Buna göre fibroblastik reaksiyon açısından aralarında anlamlı fark bulunmadı ($p=6271$) ve kontrol grubunda ortalama fibroblastik reaksiyon $1\pm0,6$ '+' olarak değerlendirildi.

HA, EGF ve Mitomisin C uygulanan timpanik membranlar arasında fibroblastik reaksiyon açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.2430$).HA, EBF veya Mitomisin C uygulanan timpanik membranlarla aynı grupta yer alan karşı kontrol timpanik membranlar arasında fibroblastik reaksiyon açısından fark olup olmadığı WM testi ile değerlendirildi; Buna göre, HA ile kontrol A arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0.3173$), EBF ile kontrol B arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0.6858$), Mitomisin C ile kontrol C arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0.1797$).

Tablo 4. Neovaskülarizasyon

Gün	HA uygulanan (A grubu)	EBF uygulanan (B grubu)	MIT uygulanan (C grubu)	Kontrol A	Kontrol B	Kontrol C
3.gün	+	-	-	+	-	+
5.gün	+	-	-	+	-	+
7.gün	+	+	+	+	+	+
9.gün	+	+	+	+	+	+
14.gün	+	+	+	-	-	+
Toplam	5+	3+	3+	4	2	5

(HA: Hyaluronik asit, EBF:Epidermal Büyüme Faktörü, Mitomisin C)

Neovaskülarizasyon açısından A, B ve C grupları arasındaki farklılığı test etmek için her üç kontrol grubundan elde edilen veriler Chi square testi ile karşılaştırıldı. Kontrol grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p=0.2052$).

HA, EBF ve Mitomisin C uygulamaları arasında neovaskülarizasyon varlığı açısından karşılaştırmada Chi square testi ile yapıldı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.2557$).

HA, EGF veya MIT uygulanan timpanik membranlarla bunlara karşı olan kontrol timpanik membranlar arasında neovaskülarizasyon varlığı açısından karşılaştırmada Mc Nemar testi uygulandı; Buna göre,

HA ile Kontrol A arasında farkın istatistiksel olarak anlamsız ($p=0.1000$),

EGF ile Kontrol B arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamsız ($p=0.1000$),

MIT ile Kontrol C arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamsız ($p=0.5930$) olduğu bulundu.

Tablo 5. Epitel katı kalınlığı (mikrometre)

Gün	HA uygulanan (A grubu)	EBF uygulanan (B grubu)	MİT uygulanan (C grubu)	Kontrol A	Kontrol B	Kontrol C
3.gün	7.5	5	10	5	10	15
5.gün	2.5	10	15	10	10	15
7.gün	2.5	10	7.5	7.5	10	10
9.gün	2.5	25	20	7.5	7.5	20
14.gün	7.5	10	10	7.5	7.5	20
Ortalama	4.5±2.7	12±7.5	12.5±5	7.5±1.7	9±1.3	16±4

(HA: Hyaluronik asit, EBF: Epidermal Büyüme Faktörü, MİT: Mitomisin C)

A, B ve C grupları arasındaki farklılığı değerlendirmek için öncelikle kontrol gruplarının epitel tabakası kalınlığı KW testi ile karşılaştırıldı. Buna göre kontrol A, kontrol B ve kontrol C arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p=0.0087$); kontrol C grubunda en yüksek, kontrol A grubunda en düşük değer bulundu. HA, EBF veya Mitomisin C uygulanan timpanik membranlar ile karşı kontrol timpanik membranları arasındaki farklar hesaplanarak F değeri bulundu ve HA, EBF ve Mitomisin C arasında epitel katı kalınlığı açısından karşılaştırma düzeltilmiş F değerine göre yapıldı. Bu şekilde HA, EBF ve Mitomisin C uygulanan timpanik membranlar arasında epitel kalınlığı açısından karşılaştırma KW testi ile yapıldı ve aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.0210$). HA uygulanan timpanik membranla EBF uygulanan timpanik membran arasındaki karşılaştırma MWU testi ile yapıldı ve aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.0241$). HA uygulanan timpanik membran ile Mitomisin C uygulanan timpanik membran arasındaki farklılık da istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0.0135$). EBF uygulanan timpanik membranlar ile Mitomisin C uygulanan timpanik membranlar arasındaki farklılık ise istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0.7382$).

HA, EBF veya Mitomisin C uygulanan timpanik membranlar ile karşı kontrol timpanik membranlar arasındaki karşılaştırma WMP testi ile yapıldı; HA ile kontrol A arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamsız ($p=0.1441$), EBF uygulanan timpanik membranlar ile kontrol B arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamsız ($p=5930$), Mitomisin C uygulanan timpanik membranlar ile kontrol C arasındaki farklılık da istatistiksel olarak anlamsız ($p=0.1088$) olarak bulundu.



Tablo 6. Keratin kalınlığı (mikrometre)

Gün	HA uygulanan (A grubu)	EBF uygulanan (B grubu)	MIT uygulanan (C grubu)	Kontrol A	Kontrol B	Kontrol C
3.gün	5	0	5	2.5	2.5	10
5.gün	1.5	0	10	5	10	5
7.gün	1	15	15	2.5	40	10
9.gün	0.5	5	20	2.5	5	60
14.gün	5	2.5	5	2.5	5	15
Ortalama	2.6±2.2	4.5±6.2	11±6.5	3±1	12.5±15.6	20±22.6

(HA: Hyaluronik asit, EBF:Epidermal Büyüme Faktörü, MIT: Mitomisin C)

A,B ve C grupları arasındaki farklılığı test etmek için öncelikle her üç kontrol grubunun keratin tabaka kalınlığı KW testi ile karşılaştırıldı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu için ($p=0.0199$), madde uygulanan taraftaki keratin kalınlığı ile kontrol TM daki keratin kalınlığı farkı hesaplanarak F değeri bulundu. Düzeltilmiş F değeri kullanılarak HA, EBF ve Mitomisin C uygulanan gruplar arasında keratin kalınlığı açısından karşılaştırma KW testi ile yapıldı ve her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi ($p=0.0687$).

HA, EBF ve Mitomisin C uygulanan timpanik membranlar ile karşı kontrolleri arasındaki karşılaştırmada WMP testi kullanıldı; Buna göre HA uygulanan timpanik membranlardaki keratin kalınlığı ile kontrol A grubundaki keratin kalınlığı arasında farklılığın istatistiksel olarak anlamsız ($p=0.8927$), EBF uygulanan timpanik membranlardaki keratin kalınlığı ile kontrol B grubundaki keratin kalınlığı arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamsız ($p=0.0679$), Mitomisin C uygulanan timpanik membranlardaki keratin kalınlığı ile kontrol C grubundaki keratin kalınlığı arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamsız ($p=3452$) olduğu bulundu.

Tablo 7.Kurut alanı

Gün	HA uygulanan (A grubu)	EBF uygulanan (B grubu)	MİT uygulanan (C grubu)	Kontrol A	Kontrol B	Kontrol C
3.gün	11	-	-	20	-	14
5.gün	16	17	5	21	3	13
7.gün	12	8	-	6	20	-
9.gün	17	15	6	-	6	6
14.gün	-	-	-	-	-	-
Ortalama	11±6.7	8±8	2.2±3	9.4±10	5.8±8	6.6±6.7

(HA:Hyaluronik asit, EBF: Epidermal Büyüme Faktörü, MİT: Mitomisin C)

A, B ve C grupları arasındaki farklılığı test etmek için öncelikle her üç kontrol grubunun kurut alanları KW testi ile karşılaştırıldı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı belirlendi ($p=0.8349$). HA, EBF ve Mitomisin C uygulanan timpanik membranlar arasında kurut alanı açısından karşılaştırma KW testi ile yapıldı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.1457$).

HA, EBF veya Mitomisin C uygulanan timpanik membranlarla karşı kontrolleri arasındaki farklılığı belirlemek için WMP testi uygulandı, buna göre; HA uygulanan timpanik membranlardaki kurut alanı ile kontrol A grubundaki kurut alanı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.7150$),

EBF uygulanan timpanik membranlardaki kurut alanı ile kontrol B grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.5930$), Mitomisin C uygulanan timpanik membranlardaki kurut alanı ile kontrol C grubundaki kurut alanı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.1797$).

4. TARTIŞMA

Timpanik membran histolojik olarak dışta epitel, ortada fibröz ve içte mukoza tabakalarından oluşan üç katlı bir yapıdır (1). Dış kulak yolu cildi ile devamlılık gösteren epitel tabakası çok katlı squamöz epitel ile döşelidir. Tek katlı epitelden oluşan mukoza tabakası da orta kulak mukozası ile devamlılık gösterir. Pars tensa' da orta kat esas olarak kollajen yapıdaki radier ve sirküler liflerden oluşmuştur, pars flaksidada ise orta tabakada herhangi bir düzenlemeden yoksun elastin ve kollajen lifler yer alır. Timpanik membranın vasküler beslenmesi timpanik anulus, manibrium mallei, anterior ve posterior malleolar foldlar çevresine yoğunlaşmıştır (13,14).

Çeşitli nedenlerle oluşan timpanik membran perforasyonlarının %90' ı kendiliğinden iyileşir (1-4). İyileşme mekanizması ele alındığında timpanik membranı vücuttaki diğer dokulardan ayıran iki önemli özellik vardır. Bunlardan ilki; çok katlı squamöz epitel katın timpanik membranın santralinden perifer ve dış kulak yoluna doğru devamlı bir migrasyon halinde olmasıdır. İkincisi; timpanik membran perforasyonunda rejenerasyon gösteren epitele altta destek görevi gören, reperatif hücrelere ve besinlere geçiş sağlayacak önceden oluşmuş bir matriksin bulunmamasıdır. Diğer dokularda olan yara iyileşme sürecinde oluşan fibröz dokunun epitelizasyondan önce defekti doldurması özelliğine sahip olmamasına karşın, timpanik membranın belirgin bir kendi kendini tamir etme yeteneği vardır (2, 3, 4).

Çeşitli çalışmalarda akut travmatik timpanik membran perforasyonundan sonra oluşan spontan tamir aşamaları tarif edilmiştir (1-7). Travma sonrası perforasyon kenarlarında öncelikle bir eksuda ve fibröz tabakada ödem meydana gelir. Her iki yüzdeki epitelde nekroz gözlenir ve oluşan eksuda perforasyon kenarlarını koruyarak dehidratasyonu

önler. Bir iki gün içerisinde rezidüel timpanik membranın squamöz epitel katında belirgin bir proliferasyon ve perforasyon kenarlarında aşırı keratin birikimi gözlenir. Epitelyal proliferasyon, perforasyon kenarının biraz uzağında, vasküler beslenmenin yoğun olduğu anulus, manibrium mallei ve malleolar kıvrımlar tarafında yoğundur. Prolifere olan epitel hücreleri önlerindeki keratini de iterek perforasyon merkezine doğru migrasyon gösterirler. Epitel periferden migrasyon sonucu rejenera olduğu için bazal tabakası yoktur (13). Bu nedenle perforasyonun kapanması önce keratinle olur ve takiben dıştaki epitel tabakası perforasyonu örter. Üçüncü günden sonra fibröz tabakada kapiller tomurcuklanmalar ve fibroblastlar ortaya çıkar ve perforasyon büyüklüğüne bağlı olarak çoğunlukla 7-21 günde kapanır. İzleyen 4-8 haftalık sürede fibröz tabaka normaldeki karakteristik lif düzeninden yoksun kollajenöz bir tabakaya dönüşür. Klinik olarak şeffaf, ince bir görüntüye sahip olan yeni membranın sadece squamöz epitel ve mukoza katından oluştuğu kanısı bulunmasına rağmen ultrastrüktürel incelemede genellikle ince bir fibröz tabakanın bulunduğu belirlenmiştir (14).

Enfeksiyon ve epitelyal köprüleşmeyi önleyecek kadar büyük bir perforasyon olması gibi nedenlerden dolayı kapanmanın olumsuz etkilendiği durumlarda; hastanede kalış sürecini kısaltmak, maliyeti düşürmek gibi amaçlarla mikrocerrahi dışında alternatif tedavi yöntemi arayışına gidilmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda Hyaluronik Asit ve EBF' nün lokal uygulamasıyla timpanik membran perforasyonlarının kapanması üzerine yararlı etkiler elde edildiğini bildiren çok sayıda araştırmalar yapılmıştır (15,16,17,18,22,23,25).

Hyaluronik Asit tüm konnektif dokularda bir matriks bileşeni olarak bulunan, yüksek molekül ağırlıklı bir polisakkarittir (8). Farklı canlı türlerinde bulunan Hyaluronik Asit esasen kimyasal olarak aynıdır. Ticari formu sıklıkla oftalmolojide, anterior segment cerrahisinde korneal endotele ve diğer dokulara zarar vermemek amacıyla viskoelastik özelliğinden yararlanarak geniş bir anterior segment sağlamak için ve anterior ve posterior segmentlerde dokuları ayırmak için kullanılmaktadır (31).

Hyaluronik Asit' in (%1 Healon) timpanik membran perforasyonuna etkisini araştıran ilk çalışmayı Stenfors ve ark. (1985) yayınlamışlardır. Bu çalışmada, ratlarda deneysel akut timpanik membran perforasyonuna lokal uygulandığında Hyaluronik Asit' in iyileşme hızını belirgin olarak artırdığı gözlenmiş; tedavi edilmeyen perforasyonlar 10-11 günde iyileşirken, Hyaluronan uygulanan perforasyonların ortalama 6. günde kapandığı belirlenmiştir (15).

Hellström ve Laurent (1987), ratlarda travmatik akut timpanik membran perforasyonuna farklı yoğunluklarda (%1 ve %1.9 Healon) lokal Hyaluronik Asit uygulaması ile serum fizyolojik uygulaması ve tedavisiz izlem sonuçlarını karşılaştırılmışlar; perforasyon kapanma sürelerini sırasıyla 3.gün, 2. gün, 8. gün ve 10. gün olarak saptamışlardır. Erken kapanma sağlayıcı etkisinin yanı sıra Hyaluronan uygulanan timpanik membranlarda daha az opasifikasyon gözlenmiş ve bu Hyaluronan'ın olası fibröz tabakayı düzenleyici etkisine bağlanmıştır (16).

Lars ve Stenfors (1987), 1 gün ile 10 yıl arası süredir varolan çeşitli büyüklükteki perforasyonlara sahip hastalarda lokal Hyaluronik Asit uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre lokal Hyaluronik Asit uygulaması ile,

perforasyon alanının timpanik membran yüzeyinin dörtte birini veya daha azını tuttuğu 19 vakanın 15 inde tam kapanma olduğu gözlenmiştir. Uygulama yöntemi olarak ise , önce perforasyon kenarı dezepitelize edilip sonra kenarlara direk Hyaluronik Asit uygulaması ile alınan sonuçların, dezepitelizasyon yapılmadan veya vektör kağıt üzerine Hyaluronik Asit uygulaması sonrası elde edilen sonuçlardan daha iyi olduğu bulunmuştur (17).

Rivas Lakarta ve ark. (1990), bir çift kör klinik çalışmada 2 ay ve 5 yıl arası süresince varolan, timpanik membran yüzey alanının yarısından azını tutan 4, yarısından fazlasını tutan 20 perforasyonda, perforasyon kenarlarına direkt olarak Hyaluronik Asit uygulaması ile plasebo uygulamasını karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada altı aylık izlem sonunda Hyaluronik Asit uygulanan grubun %50 sinde tam kapanma, perforasyon çapında %83 küçülme; plasebo grubunda ise %16,6 sinda tam kapanma, perforasyon çapında %21 küçülme saptanmıştır. Perforasyon kapanması açısından gruplar arasındaki farklılığın anlamsız olduğu ($p=0.08$), ancak perforasyon çapında küçülme açısından anlamlı farklılık bulunduğu saptanmıştır ($p=0.001$).

Bizim çalışmamızda, ratlarda termal miringotomi ile oluşturulan timpanik membran perforasyonunun kontrol grubundaki spontan kapanma süresi ortalama 15 ± 2 gün, lokal Hyaluronik Asit uygulanan perforasyonların kapanma süresi ise ortalama 8.6 ± 2 gün olarak bulunmuştur. Sonuçlarımıza göre lokal Hyaluronik Asit uygulaması ile perforasyon kapanma süresi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde kısalmaktadır ($p=0.0432$).

Hyaluronik Asit'in timpanik membran perforasyonunun kapanmasındaki olumlu etkilerinin hangi mekanizma ile ortaya çıktığı bilinmemektedir. Hyaluronik Asit %1 su içermesi ve ayrıca kolloid ozmotik etki ile su çekici özelliğe sahip olması nedeniyle (8), perforasyon kenarında ilk önce oluşan eksuda ile benzer şekilde perforasyon kenarlarına koruyucu etki görevi görüyor olabilir. Ayrıca iyileşme sürecinde aşırı üretilen keratin ve belirgin hiperplazi gösteren epitele destek rolü oynaması da düşünülen olası bir diğer etkisidir. Hyaluronik Asitin hücre fonksiyonlarını modüle ettiğine, hücre motilitesini artırdığına dair ve polimorfonükleer lokositler üzerine fagositik fonksiyonu artırıcı etki gösterdiğine dair bulgular vardır (19,20).

Timpanik membran perforasyonu kapanmasında olumlu etkileri olduğu bilinen bir diğer madde de 6000 Dalton ağırlığında, 53 amino asitli, tek zincir bir polipeptit olan EBF'dür (9). Çeşitli türler arasında EBF moleküllerinde bazı yapısal farklılıklar olmasına rağmen biyolojik aktiviteleri aynıdır; bundan dolayı biorekombinan insan EBF diğer memelilerde de aktivite göstermektedir. EBF epidermisin yanısıra diğer birçok hücre türü üzerine de etkilidir. DNA, RNA, protein ve hyaluronik asit sentezini konkomitan olarak artırarak mitojenik bir yanıt oluşturur. Hayvanlarda ve insanlarda yapılan çalışmalarda EBF'nün yara iyileşmesinde yararlı etkileri olduğu belirlenmiştir (21).

O'Daniel ve ark. (1990), domuz timpanik membranına İyodin 125 ile işaretli EBF bağlanmasını otoradyografik incelemişler ve timpanik membranın, en yüksek konsantrasyonda çok katlı squamöz epitel katında olmak üzere her üç katında da spesifik, yüksek afiniteli EBF reseptörlerine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu invitro biyokimyasal çalışma timpanik membranın EBF için bir hedef olduğu yönündeki düşüncelerle örtüşmektedir. Aynı çalışmada yer alan diğer bir protokolde 4 tane kedi

timpanik membranında bilateral cerrahi total perforasyon oluşturulduktan sonra, orta kulak ve dış kulak yolu bir tarafta EBF, bir tarafta serum fizyolojik emdirilmiş gelfoam ile doldurulmuş ve 6. günde timpanik membran anulusuyla beraber çıkarılıp incelendiğinde günlük EBF uygulanan kulak zarında serum fizyolojik uygulanana göre daha fazla epitelial ve stromal hücre proliferasyonu olduğu gözlenmiştir (22).

Mondain ve Ryan (1995), normal ve perforate timpanik membranda EBF ve Beta-Fibroblast Büyüme Faktörü ekspresyonunu incelemek için kobaylar üzerinde immunohistokimyasal bir çalışma yapmışlar ve sonuçta EBF'nün, normal timpanik membranda esas olarak timpanik anulusta, az miktarda da üst kadranda bulunduğunu saptanmışlardır. Bu çalışmada EBF düzeyinin perforasyon oluşturulduktan 36 saat sonra arttığı, üçüncü günde pik yaptığı, sekizinci günde perforasyon kapandıktan sonra normal miktarına yaklaştığı belirlenerek bu düzey değişiminin reperatif süreçle paralel olduğu sonucuna varılmıştır (23).

Somers ve ark (1998), perforasyon devamlılığında EBF miktarının belirleyici olup olmadığını araştırmak amacıyla, kadavralardan ve miringoplasti uygulanan hastalardan alınan normal ve kronik santral perforate timpanik membranlarda immunokimyasal inceleme yapmışlar; sonuçta kronik perforate ve sağlam kulak zarlarındaki EBF düzeyleri arasında fark olmadığını belirtmişlerdir (24).

Amoils ve ark (1992), önce termal miringotom ile perforasyon oluşturmuşlar, daha sonra perforasyon kenarlarından oluşturdukları mikroflepleri mukozal yüze yatırarak bir kronik timpanik membran perforasyonu modeli ortaya çıkarıp EBF'ün etkisini incelemişlerdir. Bu modelde perforasyon kenarlarının dezepitelizasyonunu takiben üzeri

vektör kağıt ve gelfoam ile kaplanmış, bir tarafa gūnaşırı 3 kez EBF, karşı tarafa ise plasebo uygulandıktan 8 hafta sonra EBF uygulanan 16 perforasyonun 13' ünde, plasebo uygulanan 16 perforasyonun 4'ünde kapanma olduğu gözlenmiştir. Histolojik incelemede EBF uygulanan zarda 10. günde belirgin kalınlık artışı (özellikle fibröz tabakada) izlenmiş, 12. haftada tüm hiperplazi ve hipertrofi bulgularının gerilemiş olduğu belirlenmiştir (25).

Bizim çalışmamızda; termal miringotomi ile oluşturulan timpanik membran perforasyonunda spontan kapanma süresi ortalama 13.4 ± 3 gün iken, lokal EBF uygulanan perforasyonlarda kapanma süresi ortalama 7.4 ± 1.6 gün olarak bulunmuştur. Lokal EBF uygulamasının bu perforasyon kapanmasını hızlandırıcı etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.0432$).

Estrem ve ark. (2000), lokal olarak uygulanan Mitomisin C ile miringotomi kapanma süresinin uzadığını bildirilmişlerdir (27). Estrem ve ark. (1999), diğer bir çalışmada, 4 gruba ayrılan 60 ratda bilateral miringotomi sonrası, sağ tarafta perforasyon kenarına Mitomisin C emdirilmiş gelfoam, bir grupta 10 dakika, bir grupta 20 dakika birer kez; bir grupta 20 ve 10 dakika süre ile aralıklı olarak iki kez uygulanmıştır. Her iki grupta kontrol olarak sol tarafta serum fizyolojik uygulanmıştır. İzlemede sol taraftaki perforasyonun 1.5 haftada, sağ tarafta ise sırasıyla 6.5, 5.5, 6.5 ve 8.5 haftada kapandığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, Mitomisin C nin kapanmayı geciktirdiği ancak uygulama doz ve aralığının istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmadığı bildirilmiştir (26).

O'reilly ve ark. (2001), ratlarda oluşturdukları total timpanik membran perforasyonunda Mitomisin C ve serum fizyolojik uygulamasını karşılaştıran çalışmalarında, tüm serum fizyolojik uygulanan perforasyonların 14. güne kadar kapandığını, Mitomisin C grubunda ise %92.5'inin 44. günde kapandığını belirlemişlerdir (28).

Bizim alışmamızda Mitomisin C uygulanan timpanik membran perforasyonlarında iki ay sonunda kapanma gözlenmemiştir.

Hyaluronik Asit ve EBF uygulaması ile kontrollere göre daha erken kapanma gözlenirken (her ikisi için de $p=0.0432$), kapanma süreleri açısından Hyaluronik Asit ve EBF arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p=0.3160$).

Histopatolojik incelemede timpanik membran kalınlığı, epitel katı kalınlığı, keratin kalınlığı, fibroblastik reaksiyon ve neovaskülarizasyon ölçümleri perforasyon kenarına yaklaşık 50 mikrometre uzaklıkta anulus tarafında yapılmıştır. Timpanik membran kalınlığı perfore timpanik membranda normale göre belirgin artış göstermesine rağmen; Hyaluronik Asit, EBF ve Mitomisin C uygulanan timpanik membranlar arasında ($p=0.1098$) ve bunlarla kontrolleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). Yine keratin kalınlığı, fibroblastik reaksiyon ve neovaskülarizasyon açısından da; ilaç uygulanan timpanik membranlar arasında ve bunlarla kontrolleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

Travma sonrası timpanik membranda görülen kalınlaşma fibröz tabakadaki ödem, enflamasyon ve neovaskülarizasyonun bir sonucu iken; perforasyonu kapatmaya yönelik asıl olay perforasyon merkezine doğru olan keratin hareketi, epitel proliferasyon ve migrasyonu ve de nihayet fibröz tabaka oluşumudur (3).

Operasyon mikroskopu ile izlemde Hyaluronik Asit ve EBF uygulanan timpanik membranlarda perforasyon kenarlarındaki kalınlık, keratin artışının verdiği açık renk ve erken kapanma gözlenmiş olmasına rağmen; histolojik düzeyde bu zarlarla kontrol kulak zarları arasında anlamlı farklılık saptanmaması; histopatolojik değerlendirmenin kantitatif olarak yapabilmek amacıyla reperatif sürecin en yoğun olduğu anulus tarafında, ancak yine de perforasyon kenarına belli uzaklıkta yapılması ve bu nedenle de perforasyon merkezine doğru olan keratin ve epitel hareketinin ölçümlere yansımamasına bağlanmıştır. Keza Mitomisin C uygulanan timpanik membranlarda cerrahi mikroskopla 2 ay süreyle izlemde perforasyonda küçülme yada kapanma gözlenmemişken; istatistiksel analiz sonucunda histopatolojik düzeyde Mitomisin C uygulanan timpanik membranlar ile Hyaluronik Asit ve EBF uygulanan ve hiç ilaç uygulaması yapılmayan karşı timpanik membranlar arasında anlamlı farklılık bulunmaması da yine bu şekilde açıklanabilir.

Epitel katı kalınlığının hyaluronik asit uygulanan zarlarda EBF ve Mitomisin C uygulanan zarlara göre daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p=0.0241$). EBF epitel hücre proliferasyonu üzerine reperatif süreçte epitelde proliferasyon ve ardından migrasyonla olumlu yönde etkiler iken, Hyaluronik Asit'in proliferatif etkisi ise tam bilinmemekte, ancak hücre motilitesini artırıcı, belki de buna bağlı migrasyonu artırıcı olduğu ve migrasyon yapan hücrelere destek görevi sağladığı düşünülmektedir. Artmış migrasyon

ve etkilenmemiş proliferasyon hızının, epitel kalınlığı açısından Hyaluronik Asit ile EBF arasındaki farklılığı açıklayabildiği sonucuna varılmıştır. Hyaluronik Asit uygulanan timpanik membranda epitel katı kalınlığı ortalama 4.5 ± 2.7 mikrometre iken; Mitomisin C uygulanan timpanik membranda 7.5 ± 1.7 mikrometre olarak ölçülmüştür. Hyaluronik Asit uygulaması ile elde edilen epitel katı kalınlığı Mitomisin C ile elde edilenden daha düşüktür ($p=0.0135$). Bu bulgu Mitomisin ile perforasyon kenarında ileri hareket önlenirken, Hyaluronik Asit'in olası migrasyon artırıcı etkisine bağlı olabilir. Ancak kontrol timpanik membranlardaki epitel kalınlığı ortalama 7.5 ± 1.7 mikrometre olarak ölçülmüş ve Hyaluronik Asit uygulanan timpanik membranlardaki ortalama epitel kalınlığı ile aralarındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p=0.1441$). Bu bulgu, Hyaluronik Asit'in hücre migrasyonunu artırarak kapanmayı hızlandırdığı düşüncesini desteklememektedir.

5. SONUÇ

Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre, lokal olarak uygulanan Hyaluronik Asit ve EBF'ün travmatik timpanik membran perforasyonunda kapanmayı hızlandırdığı ve bu etki yönünden her iki madde arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı saptanmıştır. Mitomisin C ise kapanmayı önlemektedir. Daha ileri yargılara varabilmek için ise Hyaluronik Asit, EBF ve Mitomisin C lokal uygulamasının reperatif süreç üzerine etkilerini histopatolojik düzeyde karşılaştırmak için, bölünen günlerde daha çok sayıda denek içeren ve perforasyon merkezine doğru yönelen olayları zaman bazında değerlendiren daha ileri çalışmaların yapılması gereklidir.

6. ÖZET

Timpanik membran perforasyonu enfeksiyon ve travma sonucu meydana gelir ve %90'ı spontan kapanır. Kapanmayan perforasyonlarda mikrocerrahi tedavi yöntemine başvurulmaktadır. Son zamanlarda alternatif tedavi yöntemleri arayışına gidilmiştir. Bu çalışmada timpanik membran perforasyonu kapanmasını artırıcı etki göstermesi beklenen Hyaluronik Asit ve EBF ile, perforasyon kapanmasını önleyici etki göstermesi beklenen Mitomisin C'nin lokal uygulanmasının, akut travmatik timpanik membran perforasyon modelinde kapanma süresi ve histopatolojik düzeyde timpanik membran kalınlığı, fibroblastik reaksiyon, neovaskülarizasyon, epitel kalınlığı, keratin kalınlığı ve kurut alanı üzerine etkilerini gözlemek amaçlandı.

Ortalama 300 gram ağırlığında, 30 rat, her grupta 10 adet olmak üzere üç gruba ayrıldı (A,B,C). Her üç grupta da akkor hale getirilmiş pik ucu ile timpanik membran arka üst kadranda, 1 milimetre çapında bilateral perforasyon oluşturuldu. Her üç grupta da sol taraflar kontrol amacıyla kullanıldı ve spontan iyileşmeye bırakıldı. Sağ taraftaki perforasyon üzeri A grubunda günlük 10 mikrolitre, %1 Hyaluronan emdirilmiş, B grubunda 10 mikrolitre 400 mikrogram/mililitre EBF emdirilmiş, C grubunda sadece ilk gün, 10 mikrolitre 2 miligram/mililitre Mitomisin C emdirilmiş 1-1.5 milimetre gelfoam ile kaplandı.

A, B, C gruplarında beşer hayvan perforasyon kapanma sürelerini belirlemek amacıyla otomikroskopik bakı ile izlendi ve perforasyon kapanma süreleri kaydedildi. Her üç grupta histopatolojik inceleme için 3., 5., 7., 9. ve 14. gün bir hayvan olmak üzere toplam beşer hayvan kurban edildi. Hayvanlar kurban edilinceye veya perforasyon

kapanıncaya kadar A ve B grubunda sağ taraftaki perforasyonlara günlük ilaç uygulamaya devam edildi.

Sakrifiye edilen toplam 15 rat' da timpanik membran, kemik anulusu ve 1-2 milimetre dış kulak yolu ile beraber çıkarıldı. Toplam 30 timpanik membran preparatı, histopatolojik inceleme için formol fiksasyonu ve formik asitte dekalsifikasyondan sonra manibrium malleiye dik doğrultuda, perforasyondan geçecek şekilde ikiye bölündü, parafin blokları hazırlandı ve 5 mikrometre kesitler alınıp Hematoksilen ve Eozinle boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Mikroskopik görüntü VCD kamera yardımı ile televizyon ekranına yansıtıldı. Ekranın büyütme oranı hesaplandı. Perforasyon kenarına 50 mikrometre uzaklıkta anulus tarafında, timpanik membran kalınlığı, fibroblastik reaksiyon, neovaskülarizasyon, epitel ve keratin kalınlığı ve kurut alanı büyütme oranı göz önüne alınarak ekranda değerlendirildi. Kapanma süresi ve histopatolojik bulguların istatistiksel analizi yapıldı.

A grubunda Hyaluronan uygulanan beş perforasyonda kapanma süresi ortalama 8.6 ± 1.6 gün, B grubunda EBF uygulanan beş perforasyonun kapanma süresi ortalama 7.4 ± 1.6 gün bulundu. Kontrol kulaklarda ise spontan kapanma süresi ortalama 15 ± 2 gün bulundu. Lokal Hyaluronan ve EBF uygulaması ile perforasyon kapanma süresi spontan kapanmaya göre kısalmış bulunurken ($p=0.0432$), aralarındaki fark anlamlı bulunmadı ($p=0.3160$). C grubunda Mitomisin C uygulanan beş perforasyonda iki aylık izlemde kapanma olmadı.

Histopatolojik incelemede timpanik membran kalınlığı açısından A, B ve C grupları ve ilaç uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında farklılık bulunmadı. Gruplar arasında

fibroblastik reaksiyon, neovaskularizasyon, keratin kalınlığı, kurut alanı açısından da farklılık bulunmadı. Epitel kalınlığı A grubunda hyaluronan uygulanan timpanik membranlarda ortalama 4.5 ± 2.7 mikrometre, EBF uygulanan timpanik membranlarda ortalama 12.5 ± 7.5 mikrometre, Mitomisin C uygulanan timpanik membranlarda ortalama 12.5 ± 5 mikrometre olarak ölçüldü. Hyaluronan uygulanan timpanik membranda epitel kalınlığı EBF ve Mitomisin C uygulanana göre daha düşük olarak bulundu ($p=0.0210$), ancak kontrol olarak kullanılan ve spontan iyileşmeye bırakılan karşı kulaklardaki ortalama epitel kalınlığı ile arasındaki farklılık anlamlı bulunmadı ($p=0.1441$).

Sonuç olarak deneysel akut travmatik timpanik membran perforasyonunda, lokal Hyaluronik Asit ve EBF uygulamasının kapanma süresini spontan iyileşmeye göre kısalttığı saptanmıştır. Mitomisin C ise kapanmayı önlemektedir. Ancak perforasyon kapanması periferden perforasyon merkezine doğru seyreden bir süreç olduğundan, perforasyon kapanmasını hızlandırıcı yada önleyici etkilerin histopatolojik düzeyde de gözlenmesi amacıyla, iyileşme süresi içinde belli aralıklarla daha çok sayıda denekte, perforasyon merkezine değişen uzaklıklarda histopatolojik kesit alarak yapılacak daha ileri çalışmalar gereklidir.

7. KAYNAKLAR

- 1- Davidson BJ, Morris MS. The perforated tympanic membrane. *American Family Physician* 45: 1777-1782; 1992.
- 2- Kent SE, Rhys-Evans PH. Thermal myringotomy in guinea pigs. *The Journal of Laryngology and Otology* 101: 103-115; 1987.
- 3- Johnson AP, Smallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngologica (Stockh)* 109: 406-415; 1990.
- 4- Johnson A, Havke M. The function of migratory epidermis in the healing of tympanic membrane perforations in guinea-pig. *Acta Otolaryngologica (Stockh)* 103: 81-86; 1987.
- 5- Glasscock III ME, Shambaugh Jr. GE. Closure of tympanic membrane perforations. *Surgery of the Ear*. 4th edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia 1990; 335- 349.
- 6- Stenfors LE, Carlsöö B, Salen B, Winblad B. Repair of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngologica* 90: 332-341; 1980
- 7- Söderberg Ö, Hellström S, Stenfors LE. Structural changes in the tympanic membrane after repeated tympanostomy tube insertion. *Acta Otolaryngologica (Stockh)* 102: 382-390; 1986
- 8- Toward CL. Biochemistry of hyaluronan. *Acta Otolaryngologica (Stockh) Suppl* 442:7-24; 1987
- 9- Cohen S. The epidermal growth factor (EGF). *Cancer* 51: 1787-1791; 1983
- 10- Nanney LB. Epidermal and dermal effects of epidermal growth factor during wound repair. *The Journal of Investigative Dermatology* 94: 624-629; 1990.
- 11- Brown GL, Nanney LB, Griffen J, Cramer AB, Yancey JM. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *The New England Journal of Medicine* 321: 76-79; 1989.

- 12- Kayaalp SO. Antineoplastik ilaçlar. Tıbbi farmakoloji. Hacettepe-Taş kitapçılık. Ankara 1989. Cilt 1: 1007
- 13 - Govaerts PJ, Jacob WA, Marquet J. Histological study of the thin replacement membrane of human tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngologica (stockh)* 105: 297-302; 1988.
- 14- Johnson A, Hawke M. An ultrastructural study of the skin of the tympanic membrane and external ear canal of the guinea pig. *The Journal of Otolaryngology* 14: 357-364; 1985.
- 15- Stenfors LE, Berghem L, Bloom GD, Hellström S, Söderberg O . Exogenous hyaluronic acid (Healon) accelerates the healing of experimental myringotomies. *Auris-Nasus-Larynx (Tokyo) Suppl* 12: 217-218; 1985.
- 16- Hellström S, Laurent C. Hyaluronan and healing of tympanic membrane perforations. An experimental study. *Acta Otolaryngologica (stockh) Suppl* 442: 54-61; 1987.
- 17- Stenfors LE. Treatment of tympanic membrane perforations with hyaluronan in an open pilot study of unselected patients. *Acta Otolaryngologica (Stockh) Suppl* 442: 81-87; 1987.
- 18- Rivas Lacarta MP, Casasin T, Pumarola F, Alonso A. An alternative treatment for the reduction of tympanic membrane perforations: Sodium hyaluronate. *Acta Otolaryngologica (Stockh)* 110: 110-114; 1990.
- 19- Turley EA, Bowman P, Kytryk MA. Effects of hyaluronat and hyaluronat binding proteins on cell motile and contact behaviour. *Journal Cell Sci* 78: 133-145; 1985.
- 20- Hakansson L, Hallgren R, Venge P. Regulations of granulocyte function by hyaluronic acid. *Journal Clin Invest* 66: 298-305; 1980.

- 21- McGrath MH. Peptide growth factor and wound healing. Clinics in Plastic Surgery 17: 421-432; 1990.
- 22- O'Daniel TG, Petitjean M, Jones SC. Epidermal growth factor binding and action on tympanic membranes. Ann Otolaryngology Rhinology Laryngology 99: 80-84; 1990.
- 23- Mondain M, Ryan A. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor are induced in guinea pig tympanic membrane following traumatic perforation. Acta Otolaryngologica (Stockh) 115: 50-54; 1995.
- 24- Somers T, Goovaerts G, Schelfhout L, Peeters S, Govaerts PJ. Growth factors in tympanic membrane perforations. The American Journal of Otolaryngology 19: 428-434; 1998
- 25- Amoils CP, Jackler RK, Lustig LR. Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor. Otolaryngology- Head and Neck Surgery 107: 669-683; 1992.
- 26- Estrem SA, Batra PS. Preventing myringotomy closure with topical Mitomycin C in rats. Otolaryngology Head and Neck Surgery 120: 794-798; 1999.
- 27- Estrem SA, Van Leeuwen RN. Use of Mitomycin C for maintaining myringotomy patency. Otolaryngology Head and Neck Surgery 122: 8-10; 2000.
- 28- O'Reily RC, Goldman SA, Widner SA, Cass SP. Creating a stable tympanic membrane perforation using Mitomycin C. Otolaryngology Head and Neck Surgery 124: 40-45; 2001.
- 29- Kupin TH, Juzych MS, Shin DH. Adjunctive Mitomycin C in primary trabeculectomy in phakic eyes. J. Ophthalmology 119: 30-39; 1995.
- 30- Costa VP, Spaeth GL, Eiferman RA. Wound healing modulation in glaucoma filtration surgery. Ophthalmic Surgery 3:152-170;1993.
- 31- Miller D, Stegmann R. "Healon" (Sodium hyaluronate). A guide to its use in Ophthalmic Surgery. New York :John and Sons. 1983