

Effect of Topical Dexamethasone for Preventing Experimentally Induced Myringosclerosis

Deneyisel Olarak Oluşturulan Miringosklerozun Önlenmesinde Topikal Deksametazonun Etkisi

Murat Üstündağ¹, Murat Koçyiğit¹, Erdoğan Bulut², Şemsi Altaner³, Abdullah Taş¹, Recep Yağız¹

¹Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

²Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Odyoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

³Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

Original Investigation

Özgün Araştırma

Abstract

Objective: We aimed to examine the effect of topical dexamethasone by otomicroscopic and histologic examinations for preventing myringosclerosis induced by myringotomy in rat tympanic membranes.

Methods: Twenty-one Sprague Dawley rats (42 ears) were randomly divided into the following three groups after otomicroscopic examinations: experimental surgical group (5 rats), control group (8 rats), and study group (8 rats). The rats of all the groups underwent myringotomy in both tympanic membranes. Other than myringotomy, no additional procedure was performed for the rats in the experimental surgical group. In the control group, 0.9% NaCl was applied to the ears, whereas in the study groups, topical dexamethasone was applied to the ears. These applications in the control and study groups were repeated for nine days. On the 10th day of the study, the rat ears of all groups underwent otomicroscopic and histologic examinations. The prevalence and process of myringosclerosis were evaluated by otomicroscopic examination, whereas inflammation, membrane thickness, and myringosclerosis intensity were evaluated by histologic examination.

Results: The growth of myringosclerosis with otomicroscopic examination was lesser in the study group in which topical dexamethasone was applied than the control and experimental surgical groups. Moreover, it was observed that myringosclerosis effected less quadrants in the study group.

Histologic examinations revealed that inflammation was significantly lesser in the study group than in the experimental surgical and control groups. The average membrane thickness values were significantly lesser in the study group than in the experimental surgical group. With respect to myringosclerosis growth, no statistically significant difference was observed among all groups, whereas with respect to myringosclerosis intensity, the rat ears in the study group were less severely affected.

Conclusion: Thus, our study results suggest that applying topical dexamethasone after myringotomy has positive effects on limiting the intensity and prevalence of myringosclerosis.

Keywords: Myringotomy, dexamethasone, myringosclerosis, animal model

Öz

Amaç: Deneyisel olarak sıçan timpanik membranlarında miringotomi ile oluşturulan miringosklerozun önlenmesinde, topikal deksametazonun etkinliğini otomikroskopik ve histolojik muayeneler ile araştırmayı amaçladık.

Yöntemler: Sprague-Dawley cinsi 21 sıçan (42 kulak) otomikroskopik muayeneler sonrası rastgele üç gruba [deneyisel cerrahi grubu (beş sıçan), kontrol grubu (8 sıçan), çalışma grubu (8 sıçan)] ayrıldı. Tüm gruplardaki sıçanların her iki timpanik membranlarına miringotomi yapıldı. Miringotomi sonrası deney grubundaki sıçan kulaklarına ek işlem yapılmadı. Deneyel cerrahi grubundaki kulaklara %0.9 NaCl, çalışma ve kontrol grubundaki kulaklara ise topikal olarak deksametazon uygulandı. Kontrol ve çalışma gruplarındaki uygulama dokuz gün boyunca tekrarlandı. Çalışmanın 10. gününde tüm gruplardaki kulaklar otomikroskopik ve histolojik olarak değerlendirildi. Otomikroskopik değerlendirmede miringoskleroz gelişimi ve yaygınlığı, histolojik incelemede ise; inflamasyon, zar kalınlığı ve miringoskleroz şiddeti değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmamızda topikal deksametazon uygulanan çalışma grubunda, kontrol ve deney gruplarına göre otomikroskopik olarak miringoskleroz gelişiminin daha az olduğu saptandı. Ayrıca, çalışma grubunda miringosklerozun daha az kadranı etkilediği görüldü.

Histolojik olarak incelemede, inflamasyon varlığı çalışma grubunda, deneyel cerrahi ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak daha az görüldü. Ortalama zar kalınlığı değerleri çalışma grubunda deneyel cerrahi grubuna göre anlamlı olarak düşüktü. Miringoskleroz gelişimi yönünden gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmaz iken, miringoskleroz şiddeti yönünden çalışma grubundaki sıçan kulaklarının daha hafif etkilendiği saptandı.

Sonuç: Çalışmamızın bulguları ışığında miringotomi sonrası topikal deksametazon uygulamasının miringosklerozun şiddeti ve yaygınlığını sınırlamada olumlu etkisi olacağını ileri sürebiliriz.

Anahtar kelimeler: Miringotomi, deksametazon, miringoskleroz, hayvan modeli



Address for Correspondence/Yazışma Adresi:

Murat Koçyiğit
E-mail: muratdr63@yahoo.com

Received Date/Geliş Tarihi: 15.11.2016

Accepted Date/Kabul Tarihi: 27.01.2017

© Copyright 2017 by Official Journal of the Turkish Society of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery Available online at www.turkarchotorhinolaryngol.org

© Telif Hakkı 2017 Türk Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Derneği Makale metnine www.turkarchotorhinolaryngol.org web sayfasından ulaşılabilir.

DOI: 10.5152/tao.2017.2077

Giriş

Timpanoskleroz, kulak zarı, orta kulak boşluğu, kemikçik zinciri ve nadiren de mastoidde submukozal düzeyde hyalen değişiklikler sonucu ortaya çıkan ossifikasyonlardır (1). Timpanosklerozun sadece kulak zarını etkilemesine miringoskleroz adı verilir (2, 3). Çocuklarda efüzyonlu otitis media (EOM) nedeniyle ventilasyon tüpü (VT) uygulamasının sıklığına bağlı olarak miringoskleroz insidansı bu yaş grubunda yüksektir. Ventilasyon tüpü uygulanan çocuklarda miringoskleroz insidansı %28-61 arasındadır (3, 4).

Timpanosklerozun kesin patogenezi hala tam olarak bilinmemektedir. Rekürren otitis media (ROM) sonrası oluşan özel bir skar dokusu şekli veya iyileşmiş inflamasyon olarak kabul edilmektedir. İkinci neden lamina propria üzerine seröz sıvıdaki hidrolitik enzimlerin direk etkisidir (2, 5-7). Diğer bir etiyolojik faktör ise travmadır. En basit formu olan kulak zarı orta kısmını oluşturan liflerin aşırı gerilmesinden, ağır bir form olan kulak zarı perforasyonuna kadar olan her türlü travma miringoskleroz gelişimine katkıda bulunabilir (8-10). Miringotomi ve VT uygulamasından sonra fibrozis ile iyileşen intraepitelyal kanama olabilir (11, 12). Kulak zarı içine kanamanın uzun vadede miringoskleroz gelişimi ile ilişkili olabileceğini belirten çalışmalar vardır. Bu çalışmalara göre miringotomi sırasında oluşan kanamanın azaltılması uzun dönemde miringoskleroz gelişimini azaltabilmektedir (13). Çalışmamızda deneysel olarak sıçan timpanik membranlarında miringotomi ile oluşturulan miringosklerozun önlenmesinde, topikal deksametazonun etkinliğini otomikroskopik ve histolojik olarak araştırmayı amaçladık.

Yöntemler

Bu çalışma için, 3-4 aylık ve ağırlıkları 300-400 g arasında değişen 21 adet, sağlıklı erkek Sprague-Dawley tipi sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar %50 nem, 16-21°C ısı koşullarında pelet yem ile beslenerek barındırılmıştır. Çalışmamızda uluslararası Helsinki deklarasyonunda bildirilen hayvan bakım ve kullanımı ile ilgili kurallara uyulmuş olup, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (TÜHDEYEK-2009/006 protokol no'lu).

Sıçanlarda miringotomi ketalar anestezisi altında gerçekleştirildi. Ketalar anestezisi, ketamin hidroklorür (Ketalar ampul; Pfizer, İstanbul, Türkiye) 40 mg/kg intramusküler (i.m) ve xylazine hidroklorür (Rhompun ampul; Bayer, İstanbul, Türkiye) 5 mg/kg/i.m ile sağlandı. Ketalar anestezisi altında toplam 21 sıçanın 42 kulağının otomikroskopik bakısı yapıldı, dış kulak yolundaki debris veya buşonlar temizlendi. Bütün sıçanlarda normal timpanik membran görüntüsü saptandı.

Otomikroskopik muayeneler sonrası; sıçanlar rastgele deneysel cerrahi grubu (I. grup), kontrol (II. grup) ve çalışma grubu (III. grup) şeklinde üç gruba ayrıldı. Deneysel cerrahi grubu beş, kontrol ve çalışma grupları ise sekiz sıçandan oluşturuldu. Tüm gruplarda otomikroskop altında kulak spekulumu vasıtasıyla insülin (PPD) enjektör pistonu ucuna dental iğne takılarak her iki taraf kulak zarlarının ön ve arka kadranını içeren standart 2 adet miringotomi yapıldı.

I. Grup (deneysel cerrahi grubu): Beş sıçanın 10 kulağına miringotomi işlemi sonrası herhangi bir ilaç uygulanmadı.

II. Grup (kontrol grubu): Sekiz sıçanın 16 kulağına miringotomiyi takiben yaklaşık 0.3 cc %0.9 NaCl damlatıldı.

III. Grup (çalışma grubu): Sekiz sıçanın 16 kulağına ise miringotomi takiben yaklaşık 0.3 cc (8 mg/2 mL) deksametazon [Deksametazon 21-fosfat (Dekort ampul; Deva, İstanbul, Türkiye)] damlatıldı.

Kontrol ve çalışma grubunda yer alan sıçanlarda damlatılan ajanlar çalışmanın ikinci gününden itibaren ketalar anestezisi verilmeden, bir yardımcının yardımı ile sıçanlar sabit tutularak aynı kulaklara ikişer damla daha uygulandı ve bu uygulama dokuz gün boyunca sürdürüldü. Damlatma işleminin uygulandığı gruplarda 5-8. günler arasında kontrol grubundan iki ve çalışma grubundan iki adet sıçan kaybedildi. Deneysel cerrahi grubunda hayvan kaybı yaşanmadı.

Çalışmanın 10. gününde ketalar anestezisi altında; deneysel cerrahi grubu (beş sıçan, 10 kulak), kontrol grubu (altı sıçan, 12 kulak) ve çalışma grubunda (altı sıçan, 12 kulak) yer alan toplam 17 sıçanın (34 kulak) timpanik membranları otomikroskopik muayene ile incelendi. Timpanik membran görünüşleri ve miringoskleroz gelişimi 4 kadrandaki dağılıma göre değerlendirildi. Daha sonra sıçanlar yüksek doz ketamin hidroklorür ve xylazine hidroklorür enjeksiyonu ile sakrifiye edildi. Takiben histolojik incelemelerde kullanılmak üzere sıçanların temporal kemik diseksiyonuna geçildi.

Temporal kemik diseksiyonu

Kulakların temporal kemik diseksiyonları, timpanik bulla ve timpanik membrana hızlı erişim sağlayacak bir teknik ile gerçekleştirildi. Oksipital bölgeden horizontal insizyon yapıldı ve cilt öne doğru eleve edildi. Her iki taraftaki temporal kas ve periost önce parietal kemiğin, ardından temporal skuamöz parçasının üzerinden eleve edildi. Aurikula laterale ekarte edilerek kırıldak dış kulak yolu, keskin diseksiyon ile timpanik halkadan ayrıldı. Subperiosteal planda kas dokularının elevasyonuna devam edilerek, temporal kemiğin mastoid ve timpanik parçaları (bulla) ortaya konuldu. Bundan sonraki aşamada mastoid parça oksipital kemikten; skuamöz parça parietal, frontal, palatin ve etmoid kemiklerden; bulla oksipital ve sfenoid kemiklerden; petröz parça sfenoid kemikten diseke edildi. Temporal kemik, çevre kas dokularından da diseke edilerek kafatasından ayrıldı. Bu aşamadan sonra histolojik olarak incelenmesi planlanan dokular %10 formaldehit çözeltisine konuldu ve üç gün çözelti içinde bırakılan dokular otomikroskop altında temporal bullaya paralel şekilde açılarak temizlendi. Böylece timpanik membranlar orta kulak ve dış kulak tarafından görünür hale getirildi. Temporal kemik diseksiyonu ve timpanik membranların çıkarılması sırasında deney grubundan iki adet, kontrol grubundan iki adet ve çalışma grubundan da iki adet timpanik membran hasar gördüğü için çalışma dışı bırakıldı. Histolojik inceleme için deneysel cerrahi grubundan 8, kontrol grubundan 10 ve çalışma grubundan 10 adet timpanik membran çalışmaya dahil edildi.

Histolojik değerlendirme

Rutin parafin takip protokolü ile elde edilen parafin bloklardan manibrium malleiye paralel dört mikronluk kesitler alınarak, deparafinize ve rehidrate edildikten sonra, Hematoksilen-Eosin boyası ile boyandı ve kesitler Axioplan 2 imaging - Zeiss (California, USA) ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

Histolojik incelemede tüm gruplardaki kulakların timpanik membranları; enflamasyon varlığı/yokluğu, zar kalınlığı ve miringoskleroz varlığı/yokluğu açısından değerlendirildi. Ayrıca miringoskleroz tespit edilen membranlarda lamina propriadaki fibroblastik proliferasyonun yoğunluğuna ve sklerozun derecesine göre hafif, orta, şiddetli miringoskleroz şeklinde sınıflandırma aynı patoloj tarafından yapıldı. Miringoskleroz derecelendirmesinde Mattsson ve ark. (14) kullandığı sınıflandırma kullanılmış olup lamina propria birkaç adet tek lezyon mevcut ise hafif (MS+), tek ama birleşme eğilimi olan lezyonlar mevcut ise orta (MS++) ve geniş lezyonlar için de şiddetli (MS+++) şeklinde derecelendirildi.

Sıçanların otomikroskopik incelemeleri ve işlemleri, temporal kemik diseksiyonu ve histolojik değerlendirmeler, alanlarında en az 15 yıl tecrübeli Kulak Burun Boğaz ve Patoloji uzmanlarının yapılmıştır.

Çalışmanın istatistiksel analizi Minitab paket programı (S0064 Minitab Release 13, lisans no: wep 1331, 00197, Coventry, İngiltere) kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analizlerde, normal dağılıma uygunluğu araştırıldıktan sonra, non-parametrik ölçüm değerlerinin grup içi karşılaştırmasında Wilcoxon testi, iki grup karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. İki-den fazla grup karşılaştırması ise Kruskal-Wallis testi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi %95 güven aralığında $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

Çalışma grubundan bir sıçana ait olan ve normal sınırlarda olarak değerlendirilen timpanik membran görüntüsüne Resim 1'de yer verilmiştir.

Bulgular

Otomikroskopik bulgular

Çalışmamızın 10. gününde üç grupta toplam 17 sıçanın (34 kulak) otomikroskopik değerlendirmesinde; miringotomi yerlerinin kapanması, miringoskleroz gelişimi ve miringoskleroz geliş-

miş olan timpanik membranlarda miringosklerozun kadranslara göre dağılımı yönünden inceleme yapıldı.

Miringotomi yerlerinde kapanma

Miringotomi yerlerinin kapanması açısından incelendiğinde; çalışma grubunda (miringotomi+deksametazon) yer alan 12 kulağın 11'i (%91.6), kontrol grubunda (miringotomi+%0.9 NaCl) bulunan 12 kulağın 10'u (%83.3) ve deneysel cerrahi grubunda (sadece miringotomi) bulunan 10 kulağın 9'unun (%90) timpanik membranlarının intakt olduğu görüldü. Gruplar arasında 10. günde miringotomi yerlerinin kapanması açısından değerlendirme yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.595$).

Miringoskleroz gelişimi

Tüm gruplardaki kulaklar (34 kulak) otomikroskopi ile miringoskleroz varlığı yönünden değerlendirildiğinde; çalışma grubunda 12 kulağın yedisinde (%58.3), kontrol grubunda 12 kulağın 11'inde (%91.7) ve deney grubunda tüm timpanik membranlarda (%100) miringoskleroz gelişimi tespit edildi. Otomikroskopik miringoskleroz gelişimine göre gruplar arası istatistiksel karşılaştırma Tablo 1'de gösterildi.

Kadranslara göre miringosklerozun dağılımı

Otomikroskopik olarak miringosklerozun dağılımı incelendiğinde ise, çalışma grubunda yer alan sıçan timpanik membranlarında diğer iki gruba göre miringosklerozun daha az alanda geliştiği saptandı (Tablo 2). Otomikroskopik değerlendirme ile miringoskleroz gelişim ve dağılımının; miringotomi yapılan alanlarla sınırlı kalmadığı daha çok malleus çevresinde ve anterior timpanik membranda yoğunlaştığı görüldü. Kadranslara göre miringoskleroz dağılımının eşleştirilmiş gruplar arası istatistiksel karşılaştırılması Tablo 3'te gösterildi.

Histolojik bulgular

Histolojik inceleme için 10. günde tüm gruplarda toplam 28 timpanik membranda; inflamasyon, zar kalınlığı ve miringoskleroz gelişimi değerlendirildi.

Tablo 1. Otomikroskopik miringoskleroz gelişimine göre gruplar arası istatistiksel karşılaştırma

Eşleştirilmiş gruplar	p*
Deneyel cerrahi grubu - Kontrol grubu	0.403
Kontrol grubu - Çalışma grubu	0.038
Çalışma grubu - Deneyel cerrahi grubu	0.021

*Mann-Whitney U test

Tablo 3. Kadranslara göre miringoskleroz dağılımının eşleştirilmiş gruplar arası istatistiksel karşılaştırılması

Eşleştirilmiş gruplar	p*
Deneyel cerrahi grubu - Kontrol grubu	0.520
Kontrol grubu - Çalışma grubu	0.102
Çalışma grubu - Deneyel cerrahi grubu	0.044

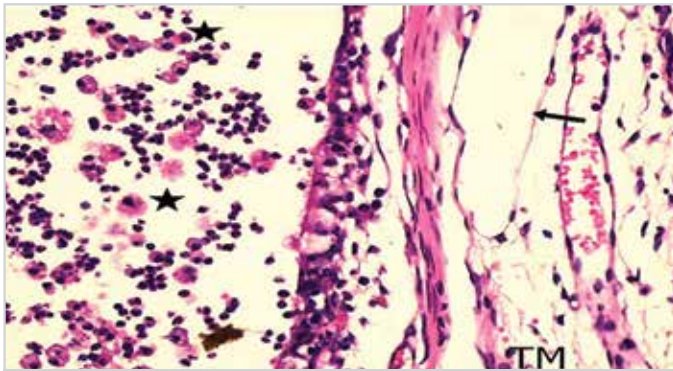
*Mann-Whitney U test

Tablo 2. Otomikroskopik değerlendirmeye göre miringoskleroz bulgularının kadranslara göre dağılımı

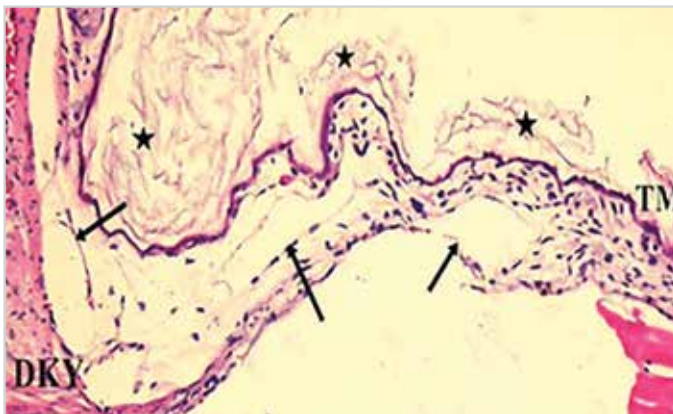
Gruplar	Kadranslara göre miringoskleroz dağılımı				
	Yok n=kulak sayısı, (%)	1 kadrans (+) n=kulak sayısı, (%)	2 kadrans (+) n=kulak sayısı, (%)	3 kadrans (+) n=kulak sayısı, (%)	4 kadrans (+) n=kulak sayısı, (%)
Deneyel cerrahi grubu (n=10 kulak)	0 (0)	2 (20)	3 (30)	2 (20)	3 (30)
Kontrol grubu (n=12 kulak)	1 (8.3)	2 (16.6)	5 (41.6)	3 (25)	1 (8.3)
Çalışma grubu (n=12 kulak)	5 (41.6)	3 (25)	2 (16.6)	1 (8.3)	1 (8.3)



Resim 1. Çalışma grubundan bir sıçana ait normal kulak zarı görüntüsü (H&E X 200)
TM: timpanik membran



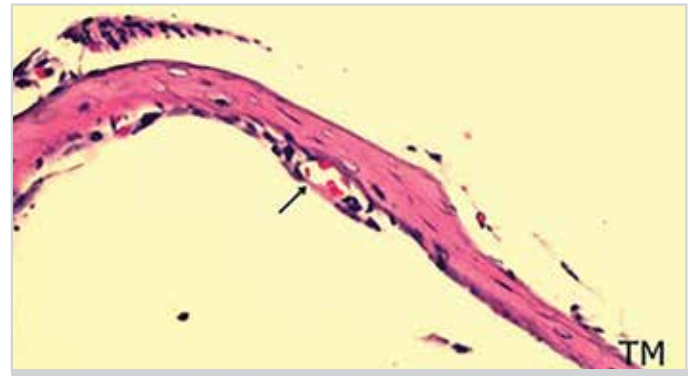
Resim 2. Deneysel cerrahi grubundan bir sıçana ait kulak zarı görüntüsü (H&E X 200)
↓: miringosklerotik plaklar; ★: inflamasyonlu alanlar; TM: timpanik membran



Resim 3. Kontrol grubundan bir sıçana ait kulak zarı görüntüsü (H&E X 200)
↓: miringosklerotik plaklar; ★: İnflamasyonlu alanlar; TM: timpanik membrane; DKY: dış kulak yolu

İnflamasyon

Histolojik incelemeye alınan tüm gruplardaki sıçan timpanik membranları inflamasyon açısından değerlendirildiğinde; çalış-



Resim 4. Çalışma grubundan bir sıçana ait kulak zarı görüntüsü (H&E X 200)
↓: inflamasyonlu alanlar; TM: timpanik membran

Tablo 4. Histolojik olarak eşleştirilmiş gruplarda inflamasyon bulgusunun ve zar kalınlığının istatistiksel karşılaştırılması

Eşleştirilmiş gruplar	İnflamasyon bulgusu p*	Zar kalınlığı p*
Deney grubu - Kontrol grubu	1.0	0.205
Kontrol grubu - Çalışma grubu	0.048	0.093
Çalışma grubu - Deney grubu	0.025	0.039

*Mann-Whitney U test

ma grubunda 10 kulağın sekizinde (%80), kontrol grubunda 10 kulağın tamamında (%100) ve deneysel cerrahi grubunda 8 kulağın tamamında (%100) inflamasyon varlığı tespit edildi. Histolojik olarak eşleştirilmiş gruplarda inflamasyon bulgusunun istatistiksel karşılaştırılması Tablo 4'de gösterildi.

Deneysel cerrahi grubundan bir sıçana ait timpanik membranda miringosklerotik plaklar ve yoğun inflamatuvar hücreler (köpüksü histiyositler, lökositler) Resim 2'de gösterildi. Kontrol grubundan bir sıçana ait timpanik membranda, lamina propriyada yaygın miringosklerotik plaklar ve özellikle timpanik membranın mukozal yüzeyinde daha yoğun yerleşmiş olan inflamasyonlu alanlar Resim 3'te gösterildi. Resim 4'te ise çalışma grubundan bir sıçana ait timpanik membranda mukozal yüzeyde inflamatuvar hücrelerin (lökositler ve köpüksü histiyositler) birikimi gösterildi.

Timpan membran kalınlığı

Histolojik çalışmaya dahil edilen tüm timpanik membranların kalınlıkları değerlendirildiğinde; çalışma grubunda, deneysel cerrahi ve kontrol gruplarına göre ortalama kalınlığının daha az olduğu tespit edildi. Zar kalınlıkları açısından gruplar arası karşılaştırma yapıldığında deneysel cerrahi grubu ile kontrol grubu ve çalışma grubu ile kontrol grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmadı (sırasıyla, p=0.205 ve p=0.093). Çalışma grubu ile deneysel cerrahi grup arasında ise istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptandı (p=0.039) (Tablo 4).

Deneysel cerrahi grubundan bir sıçana ait timpanik membranda perforasyon ve perforasyon alanına yakın bölgelerde membran kalınlık artışı ve inflamasyonlu alanlar Resim 5'te gösterildi. Kontrol grubundan bir sıçana ait timpanik membrandaki kalınlık artışı ve ölçme metodu Resim 6'da gösterilmiştir.

Tablo 5. Histolojik değerlendirmeye göre miringoskleroz bulguları

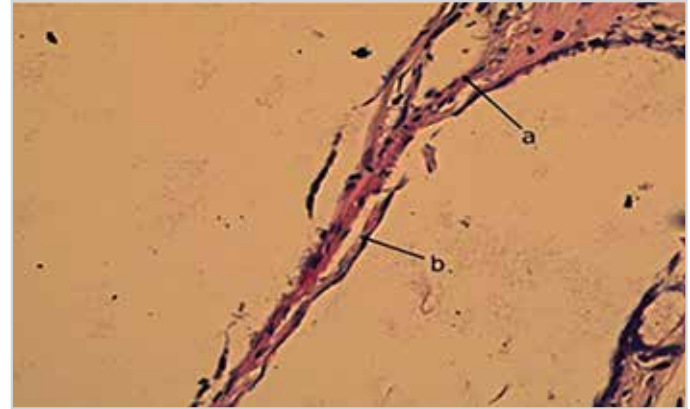
Gruplar	Miringoskleroz şiddetine göre dağılım			
	MS (yok) n=kulak sayısı, (%)	MS (+) n=kulak sayısı, (%)	MS (++) n=kulak sayısı, (%)	MS (+++) n=kulak sayısı, (%)
DeneySEL cerrahi grubu (n=8 kulak)	0 (0)	1 (12.5)	3 (37.5)	4 (50)
Kontrol grubu (n=10 kulak)	1 (10)	2 (20)	4 (40)	3 (30)
Çalışma grubu (n=10 kulak)	2 (20)	5 (50)	3 (30)	0 (0)

MS: Miringoskleroz; MS (+): hafif miringoskleroz; MS (++): orta miringoskleroz; MS (+++): şiddetli miringoskleroz



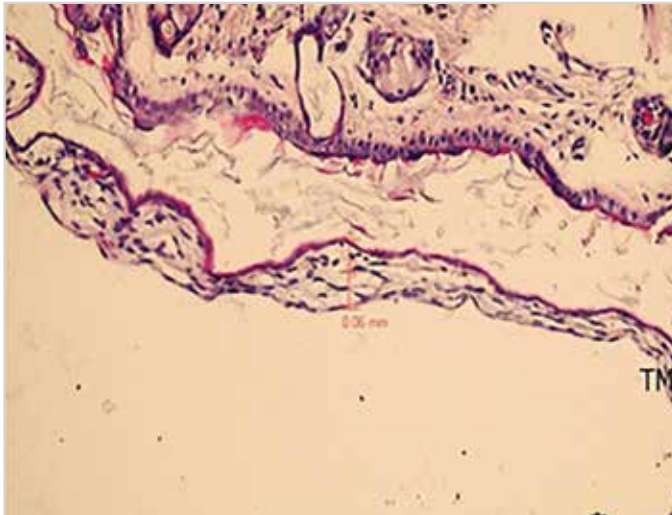
Resim 5. DeneySEL cerrahi grubundan bir sıçana ait kulak zarı görüntüsü (H&E X 200)

a: perforasyon alanı; b: inflamasyonlu ve kalınlaşmış alanlar



Resim 7. DeneySEL cerrahi grubundan bir sıçana ait kulak zarı görüntüsü (H&E X 200)

↓: miringosklerotik plaklar; a: MS (++) orta miringoskleroz, b: MS (+) hafif miringoskleroz; MS: miringoskleroz



Resim 6. Kontrol grubundan bir sıçana ait kulak zarı görüntüsü (H&E X 200). Zardaki kalınlık artışı gösterilmiştir

TM: timpanik membran

Miringoskleroz

Tüm gruplardaki sıçan timpanik membranları histolojik olarak miringoskleroz gelişimi açısından değerlendirildiğinde; çalışma grubunda 10 kulağın sekizinde (%80), kontrol grubunda 10 kulağın dokuzunda (%90) ve deneySEL cerrahi grubun da 8 kulağının tamamında (%100) miringoskleroz tespit edildi (Tablo 5).

Tablo 6. Miringoskleroz şiddetine göre eşleştirilmiş gruplar arası istatistiksel karşılaştırılma

Eşleştirilmiş gruplar	p*
DeneySEL cerrahi grubu - Kontrol grubu	0.290
Kontrol grubu - Çalışma grubu	0.005
Çalışma grubu - DeneySEL cerrahi grubu	0.005

*Mann-Whitney U test

Histolojik olarak, 10. günde yapılan miringoskleroz gelişimi değerlendirilmesinde; çalışma, deneySEL cerrahi ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık izlenmedi ($p=0.005$) Çalışma grubu ile deneySEL cerrahi grubu ve çalışma grubu ile kontrol gruplarının karşılaştırmasında çalışma grubunda miringoskleroz şiddetinin istatistiksel olarak daha az olduğu görüldü ($p=0.005$) Diğer yandan deneySEL cerrahi grubu ile kontrol grubu karşılaştırmasında ise miringoskleroz şiddeti açısından bir fark tespit edilmedi ($p=0.290$) (Tablo 6).

DeneySEL cerrahi grubundan bir sıçan timpanik membran görüntüsünde 1-2 alanda lamina propriyadaki miringosklerotik plaklar gösterilmektedir (Resim 7). Resimde "a" ile gösterilen alanda MS (++) şiddetinde, "b" ile gösterilen alanda ise MS (+) şiddetinde miringoskleroz gelişimi dikkat çekmektedir.

Tartışma

Timpanosklerozun sadece kulak zarını etkilemesine miringoskleroz adı verilir. Miringoskleroz EOM, ROM, kronik otitis media ve VT uygulamasının sık görülen bir sekeli (15, 16). Her ne kadar kökeni hakkında birçok hipotez öne sürülmüşse de, etiolojisi ve patogenezi hakkında kesin bilgi yoktur. Ancak doku travması, intratimpanik hemoraji, hiperoksijenasyon, VT'ye karşı gelişen yabancı cisim reaksiyonu ve otoimmünite etiyo- loji için suçlanan faktörlerdir (15, 16).

Nadir olmayan ve önemli bir komplikasyon olan miringoskleroz hızla gelişen bir süreçtir. Mattsson ve ark. (7) timpanik membrandaki sklerotik değişikliklerin miringotomi sonrası 9 saat içinde geliştiğini bildirmişler ve histolojik olarak pars flaksidada mirin- gotomiden 12-24 saat sonra ortaya çıkan şiddetli bir inflamatuvar yanıtın oluştuğunu göstermişlerdir. Histolojik olarak olguların %80'inde görülen timpanoskleroz, otomikroskopik olarak ancak %40'ında görülebilmektedir. Bu durum otomikroskopik olarak timpanoskleroz saptanan olgularda, gerçekte (doku düzeyinde) iki kat fazla timpanoskleroz olduğunu göstermektedir (17, 18).

Biz çalışmamızda, yukarıda miringoskleroz ve timpanoskleroz ile ilgili ifade edilen literatür bilgileri ışığında miringoskleroz oluşturmak için travma modelini (miringotomi) seçtik ve ve klinik/histolojik bulguları değerlendirmek için de sıçanları 10. günde sakrifiye etmeyi tercih ettik.

Miringosklerozun etiolojisi ve patogenezi hala bilinmemekle birlikte çalışmalar bu hastalığın üç aşamada geliştiğini göstermektedir; inflamatuvar süreçlerin neden olduğu kollejen lif hasarı ile karakterize ve geri dönüşümlü olduğu varsayılan birinci aşama, fibroblastik invazyonla karakterize olan onarım aşaması, son ve geç faz ise kalsifikasyonlarla karakterize olan geri dönüşsüz olan aşamadır (15).

Genelde miringoskleroz/timpanoskleroz ile ilişkili çalışmalar bu hastalığın etiolojisini araştırmak, histolojik ve otomikroskopik bulgulara dayanarak timpanik membrandaki miringosklerozu değerlendirmek ve terapötik ajanların koruyuculuğunu araştırmak üzere yapılmıştır.

Çalışmamızda deneysel miringoskleroz oluşturulan sıçan kulaklarında patogeneze tanımlanan birinci aşama üzerinde etkisi olacağı düşünülerek topikal deksametazonun miringoskleroz gelişiminde olası önleyici etkinliği otomikroskopik ve histolojik olarak araştırılması planlanmıştır.

Literatürde deneysel miringoskleroz modeli çalışmalarda, özellikle antioksidan olarak bilinen ajanlarla önleyici tedaviler yaygın şekilde yer almaktadır. Farklı oksijen konsantrasyonlarında tutularak mirin- gotomi uygulanmış sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda; oda havasındaki hayvanlarda, hiperoksik ortamdaki miringotomi uygulanmış sıçanlardan daha az sklerotik lezyon geliştiği gösterilmiştir (14).

Mattsson ve ark. (14) bakır, çinko, süper oksit dismutaz, katalaz ve desferoksamin gibi topikal uygulanmış antioksidanların sklerotik lezyonların gelişimini önlediğini ya da azalttığını bildirmişlerdir. Spratley ve ark. (19) deneysel bir çalışmada, antioksidan ajan olan askorbik asidin topikal kullanımının sı-

çanların perfore timpanik membranlarında otomikroskopik olarak miringosklerozu önlediğini göstermişlerdir.

Özcan ve ark. (15) timpanosklerozda antioksidan etkiler üzerine yaptıkları araştırmada ajan olarak N-asetil sisteini kullanmışlar ve VT yerleştirilmiş kulakta topikal N-asetil sisteinin ilave kullanımının miringoskleroz gelişimini önlemede kullanışlı olabileceği sonucuna ulaşmışlardır. Ovesen ve ark. (20) fibroblast kültüründe N-asetil sisteinin fibroblast çoğalmasını ve kollajenin salınımını azalttığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca N-asetil sisteinin orta kulakta konnektif doku tabakasının kalınlığını azalttığını belirtmişlerdir.

Kazıkdaş ve ark. (21) bir çalışmada deneysel olarak oluşturulan miringosklerozun önlenmesinde alfa-tokoferol uygulanan deneklerde miringosklerotik plakların daha az oluştuğunu gözlemişlerdir.

Çalışmamızın bulguları incelendiğinde, otomikroskopik olarak miringoskleroz gelişiminin kontrol ve deneysel cerrahi gruplarında, topikal deksametazon uygulanan çalışma grubuna göre anlamlı şekilde daha fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca, çalışma grubundaki sıçan timpanik membranlarında daha az kadranın miringosklerozdan etkilendiği görülmüştür.

Polat ve ark. (22) miringotomi sonrası timpanoskleroz oluşumunda immunolojik uyarıma bağlı olarak inflamasyon kaynaklı reaktif oksijen türlerinin arttığını ve E vitamininin bu etkiyi azalttığı sonucuna varmışlardır. Selçuk ve ark. (23) miringotomi ve *S. Pneumonia* tip 3 inokülasyonu ile oluşturdukları deneysel miringoskleroz üzerinde, kobaylarda topikal kalsiyum kanal blokörü uygulamasının timpanosklerozun önlenmesinde bir etkinliğe sahip olduğunu vurgulamışlardır.

Çalışmamızın histolojik bulguları incelendiğinde; topikal deksametazon uygulanmış çalışma grubundaki sıçan timpanik membranlarındaki inflamasyon bulgusunun deneysel cerrahi ve kontrol grubuna göre anlamlı şekilde az olduğu görülmektedir. Yine çalışma grubundaki ortalama timpanik membran kalınlığının diğer iki gruba göre daha az olduğu görülmektedir. Ayrıca, miringoskleroz oluşumunun ve şiddetinin çalışma grubunda anlamlı şekilde azlığı dikkat çekici bulunmuştur.

Deneysel olarak oluşturulmuş EOM sonrası miringotomi yerinin kapanmasına, uygulanan deksametazon+siprofloksasin'in etkisini araştıran bir çalışmada, sağlam ve hasta kulaklarda; deksametazon+siprofloksasin grubunda hiç inflamasyon görülmemesi, kontrol grubunda ise olguların %71.4'ünde inflamasyon görülmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlarla miringotomi sonrası deksametazon+siprofloksasin tedavisi ile erken dönem inflamasyon etkilerinin ortadan kaldırılabilirliği sonucuna varılmıştır (24).

Kortikosteroidlerin inflamasyonun erken histolojik etkilerini yani kapiller dilatasyon, damar çeperine fibrin çökmesi, serodiapedez ve lokal ödem gibi etkilerini yok ettikleri düşünülürse, EOM'de miringotomi sonrası kortikosteroid tedavisiyle hastalık sürecinin oluşturduğu timpanoskleroz riski azalmaktadır. Ek olarak kortikosteroidler inflamasyonun geç histolojik belirtileri olan fibrozis, kapillerlerin proliferasyonu, kollajen birikmesi ve nedbeleşmeyi inhibe ederler ancak bu etkilerin timpanoskleroz üzerine etkileri için uzun dönem çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç

Çalışmamızın otomikroskopik ve histolojik bulguları ışığında, topikal deksametazon uygulamasının miringoskleroz oluşumunu önlemede olumlu yönde etkiye sahip olabileceği ileri sürülebilir. Bu etki deksametazonun anti inflamatuvar ve immünesupresif etkilerine bağlı olabilir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Animal Experiments Local Ethics Committee (TÜHDEYEK-2009/006).

Informed Consent: Not required in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - M.Ü., M.K., R.Y., A.T., E.B.; Design - M.Ü., M.K., R.Y., A.T., E.B.; Supervision - M.Ü., M.K., A.T., Ş.A.; Resource - M.K., R.Y., Ş.A., E.B.; Materials - M.Ü., M.K.; Data Collection and/or Processing - E.B., M.K., R.Y.; Analysis and/or Interpretation - M.Ü., M.K., A.T., Ş.A.; Literature Search - M.Ü., M.K., R.Y., A.T.; Writing - M.K., A.T., Ş.A.; Critical Reviews - M.K., A.T., Ş.A., R.Y.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır (TÜHDEYEK-2009/006).

Hasta Onamı: Bu çalışma için hasta onamına gerek yoktur.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - M.Ü., M.K., R.Y., A.T., E.B.; Tasarım - M.Ü., M.K., R.Y., A.T., E.B.; Denetleme - M.Ü., M.K., A.T., Ş.A.; Kaynaklar - M.K., R.Y., Ş.A., E.B.; Gereçler - M.Ü., M.K.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - E.B., M.K., R.Y.; Analiz ve/veya Yorum - M.Ü., M.K., A.T., Ş.A.; Literatür Taraması - M.Ü., M.K., R.Y., A.T.; Yazıyı Yazan - M.K., A.T., Ş.A.; Eleştirel İnceleme - M.K., A.T., Ş.A., R.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Kaynaklar

1. Turgut S. Kronik otit ve komplikasyonları. Koç C. Kulak burun boğaz hastalıkları ve baş boyun cerrahisi'nde. Ankara: Güneş kitabevi; 2004. s. 197-213.
2. Forseni M, Hansson GK, Bagger-Sjöback D, Hulcrantz M. An immunohistochemical study of inducible nitric oxide synthase in the rat middle ear, with reference to tympanosclerosis. *Acta Otolaryngol* 1999; 119: 577-82. [CrossRef]
3. Asiri S, Hahsam A, Anazy FA, Zakzouk S, Banjar A. Tympanosclerosis: review of literature and incidence among patients with middle-ear infection. *J Laryngol Otol* 1999; 113: 1076-80. [CrossRef]
4. Wielinga EWJ, Kerr AG. Tympanosclerosis. *Clin Otolaryngol* 1993; 18: 341-9. [CrossRef]
5. Forseni M, Hansson GK, Bagger-Sjöback D, Hulcrantz M. Infiltration of immunocompetent cells in the middle ear during acute otitis media. *Am J Otol* 1999; 20: 152-7.

6. Mattsson C, Magnuson K, Hellström S. Myringotomy: A prerequisite for the development of myringosclerosis? *Laryngoscope* 1998; 108: 102-6. [CrossRef]
7. Mattsson C, Johansson C, Hellström S. Myringosclerosis develops within 9 h of myringotomy. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1999; 61: 31-6. [CrossRef]
8. Tos M, Stangerup SE, Holm-Jensen S, Sorensen CH. Spontaneous course of secretory otitis and changes of the eardrum. *Arch Otolaryngol* 1984; 110: 281-9. [CrossRef]
9. Williams KR, Blayney AW, Lesser TH. Mode shapes of a damaged and repaired tympanic membrane as analysed by the finite element method. *Clin Otolaryngol* 1997; 22: 126-31. [CrossRef]
10. Elnor A, Ingelsledt S, Ivarsson A. The elastic properties of the tympanic membrane system. *Acta Otolaryngol* 1971; 72: 397-403. [CrossRef]
11. Parker A, Maw AR, Powell JE. Intra-tympanic membrane bleeding after grommet insertion and tympanosclerosis. *Clin Otolaryngol* 1990; 5: 203-7. [CrossRef]
12. Dawes PJ, Bingham BJ, Rhys R, Griffiths MV. Aspirating middle ear effusions when inserting ventilation tube: does it influence post-operative otorrhoea, tube obstruction or the development of tympanosclerosis? *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1991; 16: 457-61. [CrossRef]
13. Banerjee AR, Jennings C, Marshall JN, Narula AA. The effect of topical adrenaline on the development of myringosclerosis after tympanostomy tube insertion. *Am J Otol* 2000; 21: 482-4.
14. Mattsson C, Marklund SL, Hellström S. Application of oxygen free radical scavengers to diminish the occurrence of myringosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106: 513-8. [CrossRef]
15. Ozcan C, Görür K, Cinel L, Talas DU, Ünal M, Cinel I. The inhibitory effect of topical N-acetylcysteine application on myringosclerosis in perforated rat tympanic membrane. *Int J Ped Otorhinolaryngol* 2002; 63: 179-84. [CrossRef]
16. Barfoed C, Rosborg J. Secretory otitis media. Long-term observations after treatment with grommets. *Arch Otolaryngol* 1980; 106: 553-6. [CrossRef]
17. Somers TH, Goovaerts VH, Govaerts PJ, Offeciers FE. Histology of the perforated tympanic membrane and its muco-epithelial junction. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1997; 22: 162-6. [CrossRef]
18. Stenfors L, Carlsoo B, Salen B. Repair of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol* 1980; 90: 332-41. [CrossRef]
19. Spratley JE, Hellstrom SO, Mattsson C, Pais- Clemente M. Topical ascorbic acid reduces myringosclerosis in perforated tympanic membranes. A study in rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001; 110: 585-91. [CrossRef]
20. Ovesen T, Paaske PB, Elbroend O. Local application of N-acetylcysteine in secretory otitis media in rabbits. *Clin Otolaryngol* 1992; 17: 327-31. [CrossRef]
21. Kazıkdaş KC, Uğuz MZ, Erbil G, Tuğyan K, Yılmaz O, Güneli E, et al. The anti-oxidant effect of alpha-tocopherol in the prevention of experimentally induced myringosclerosis. *Otol Neurotol* 2006; 27: 882-6. [CrossRef]
22. Polat S, Öztürk O, Üneri C, Yüksel M, Haklar G, Bozkurt S. Determination of reactive oxygen species in myringotomized tympanic membranes and the effect of vitamin E. *Laryngoscope* 2004; 114: 720-5. [CrossRef]
23. Selçuk A, Akdoğan O, Özcan I, Giray S, Dere H, Özogul C. Topical Application of calcium channel blockers to reduce the progression of experimentally induced myringosclerosis and tympanosclerosis. *The Laryngoscope* 2008; 118: 697-705. [CrossRef]
24. Yazici A, Naiboglu B, Oysu C, Toros SZ, Noseri H, Karaca CT, et al. Effect of ototopical ciprofloxacin-dexamethasone on myringotomy in a rat model. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2009; 73: 301-5. [CrossRef]