T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TOPİKAL TYLOTOİNİN TİMPANİK MEMBRAN İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI : DENEYSEL ÇALIŞMA

DR. ALPEREN ÖNAL

KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

2024

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TOPİKAL TYLOTOİNİN TİMPANİK MEMBRAN İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI : DENEYSEL ÇALIŞMA

DR. ALPEREN ÖNAL

KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI:
DR.ÖĞR.ÜYESİ ATILAY YAYLACI

ETİK KURUL ONAYI: KOÜ HADYEK 7/2-2023

2024

İÇİNDEKİLER

1. ÖNSÖZ
2. TEŞEKKÜR
3. KISALTMALAR
4. ÇİZELGELER
5. ÇİZİMLER
6. GİRİŞ VE AMAÇ
7. GENEL BİLGİLER
    7.1. İnsan Kulak Embriyolojisi, Histolojisi ve Anatomisi
    7.2. Rat Kulak Anatomisi
    7.3. Cilt Yarası ve İyileşme Mekanizması
    7.4. Timpanik Membran Perforasyonu İyileşme Mekanizması
    7.5. Tylotoin Peptit
8. GEREÇ VE YÖNTEM
    8.1. Ön Çalışma
    8.2. Çalışma Günü (Birinci Gün)
    8.3. Çalışma Sonu (Otuzuncu gün)
    8.4. Histopatolojik İnceleme
    8.5. İstatiksel Değerlendirme
9. BULGULAR
    9.1. Neomemran ve Tabakalarının (Keratinize Çok Katlı Yassı Epitel, Lamina Propria, Mukoza) Ortalama Kalınlıkları
    9.2. Fibroblastik Aktivite
    9.3. Neovaskülasrizasyon
10. TARTIŞMA
11. SONUÇ VE ÖNERİLER
12. ÖZET
13. İNGİLİZCE ÖZET
14. KAYNAKLAR

1-2. ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimin her kıdeminde bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, güvenini her daim arkamda hissettiğim, cerrahide ve geleceğimde vizyonunu her zaman örnek aldığım Ana Bilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Murat Öztürk'e;

Çalışma hayatında disiplinli, dikkatli olmayı ve multidisipliner hasta yaklaşımını öğrendiğim Sayın Doç.Dr. Seher Şirin'e;

Asistanlığımın başından sonuna çalışkanlığını örnek aldığım, kulak ameliyatlarını bana sevdiren Sayın Doç.Dr. Fatih Mutlu'ya;

Özgün fikirleri ve sorularıyla farklı düşünebilmeyi öğrendiğim, tezimin hazırlanmasında büyük katkısı olan tez danışmanım Sayın Dr.Öğretim Üyesi Atılay Yaylacı'ya;

Eğitimim boyunca her zaman yol gösterici olan ve tecrübelerinden faydalandığım rol modelim, abim Dr.Öğretim Üyesi Hasan Mervan Değer'e;

Başta Öğr.Gör.Vet.Hek. Cüneyt Özer olmak üzere tüm Kocaeli Üniversitesi DETAB Çalışanlarına;

Tez süresince yaptığım harcamalarda verdikleri destek için Kocaeli Üniversitesi BAP Birimine;

Tezimin patolojik incelemesinde özverili katkıları nedeniyle Patoloji Ana Bilim Dalından Sayın Doç.Dr. Büşra Yaprak Bayrak'a;

Beş sene boyunca beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum kıdemlilerim ve tüm asistan, hemşire ve personel arkadaşlarıma;

Tezimde kullandığım ana materyalimin temin sürecinde büyük desteği olan Deniz Kural'a;

Tez sürecinde ve tüm hayatımda desteğini esirgemeyen, en yakınım, meslektaşım ve yol arkadaşım Dr. Çavgın Yıldırım'a;

Bugünlere gelmemde büyük emek sahibi olan, sevgi ve desteklerini her daim yanımda hissettiğim kardeşim Dr. M.Deniz Önal, canım annem ve babama;

Sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Alperen Önal

Nisan-2024

3. KISALTMALAR

BMP: Kemik Morfojenik Proteinleri

CTAP III: Kemokin Bağ Dokusu Aktive Edici Peptit III

CTGF: Bağ Dokusu Büyüme Faktörü

DETAB: Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi

DKY: Dış Kulak Yolu

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

GM-CSF: Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör

H&E: Hemoksilin Eosin

IL: İnterlökin

IP-10: İnterferon İndüklenebilir Protein 10

İP: İntraperitoneal

KBB: Kulak Burun Boğaz

KGF: Keratinosit Büyüme Faktörü

KOM: Kronik Otitis Media

MCP-1: Makrofaj Kemoatraktan Proteini

MMP: Metalloproteinaz

PAF: Trombosit Aktive Edici Faktör

PDGF: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü

PLGF: Plasenta Büyüme Faktörü

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

TGF-α: Dönüştürücü Büyüme Faktörü α

TGF-β: Dönüştürcü Büyüme Faktörü β

TM: Timpanik Membran

TNF-α: Tümör Nekroz Faktörü α

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

4. ÇİZELGELER

Çizelge 1: Neomembran ve neomembran katmanlarının ortalama kalınlıkları, fibroblastik aktivite ve neovaskülarizasyon değerleri

Çizge 1: Kontrol ve deney grubunda neomembranın ortalama kalınlıkları

Çizge 2: Kontrol ve deney grubunda neomembranın dış (keratinize çok katlı yassı epitel) tabakasının ortalama kalınlıkları

Çizge 3: Kontrol ve deney grubunda neomembranın orta (lamina propria) tabakasının ortalama kalınlıkları

Çizge 4: Kontrol ve deney grubunda neomembranın iç (mukoza) tabakasının ortalama kalınlıkları

Çizge 5: Deney grubundaki mukoza tabakasının kalınlıkları ile total neomembran kalınlıkları arasındaki saçılım grafiği

5. ÇİZİMLER

Şekil 1: Rat timpanik membranının taramalı elektron mikroskobu altında görüntüsü

Şekil 2: Rat kemikçik zincir, fasiyal sinir mikroskop ve kokleanın grafik görüntüsü

Şekil 3: Timpanik membranda perforasyon sonrası meydana gelen olaylar

Şekil 4: Erkek Tylototriton verrucosus

Şekil 5: Ön çalışmadaki ratın timpanik bullasının cerrahi eksizyon sonrası görüntüsü ve timpanik membrandaki perforasyon alanın (H&E) boyanmış kesitleri

Şekil 6: Çalışmada kullanılan materyaller

Şekil 7: Rat kulaklarının endoskopik görüntüleri ve çalışmanın aşamaları

Şekil 8: Çalışma sonu parsiyel iyileşme gösteren timpanik membranların endoskopik görüntüleri

Şekil 9: Timpanik bullanın çıkarılması işlemi

Şekil 10: Timpanik bullanın kasete konumlandırılması

Şekil 11: Örneklerin parafin bloklara gömülmesi

Şekil 12: Deney grubuna ait timpanik zarın histopatolojik görünümü (H&E)

Şekil 13: Kontrol grubuna ait timpanik zar histopatolojik görünüm (H&E)

Şekil 14: Deney grubuna ait timpanik zardaki kapillarize damar artışı ve kollajenizasyon (H&E)

Şekil 15: Kontrol grubuna ait timpanik zarda orta derecede kapillarize damar artışı, kollajenizasyon (H&E)

6.GİRİŞ ve AMAÇ

Timpanik membran (TM) perforasyonu, membranda bir açıklığın varlığıdır.[1] TM perforasyonu en sık olarak orta kulak enfeksiyonlarına bağlı olmakla beraber travma (avuç içi ile kulağa darbe alınması, kafa travması, dış kulak yoluna cisim sokulması, barotravma ve patlama travması) ve iatrojenik sebeplerden (kulaktan buşon ve yabancı cisim çıkarılması, ventilasyon tüpü atılması sonrası) de kaynaklanabilir.[2–5] Akut perforasyonların yaklaşık %80'i genellikle bir ay içinde kendiliğinden iyileşirken, perforasyonların üç ay veya daha uzun süre içerisinde iyileşmemesi kronik otitis media (KOM) olarak adlandırılır.[6] Kronik TM perforasyonlarında ise gelişen cerrahi teknikler ile tedavinin başarı oranının yüzde 85 ila 95 arasında olduğu bildirilmektedir[7]. KOM önemli bir halk sağlığı sorunu olup gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerdeki sosyo-ekonomik olarak yetersiz nüfuslarda %1 ila %46 arasında değişen bir prevalansa sahiptir.[1] Kronik kulak zarı perforasyonları tedavi edilmezse ciddi morbidite ve potansiyel mortalite taşır. Ayrıca, çocukta konuşma ve dil, sosyal, davranışsal ve bilişsel gelişimi ve okul performansını etkileyebilir.[1,6,8]

Kronik TM perforasyonlarında, işitmenin yeniden restorasyonu ve orta ve iç kulak yapılarını dış etkenlerden korumak için TM bütünlüğü hızlı bir şekilde yeniden sağlanmalıdır.[3,9] Bunun için günümüzde en etkili cerrahi tedavi yönteminin miringoplasti veya timpanoplasti olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir.[10–12] Bu cerrahilerde TM perforasyonunun kapanması perforasyon kenarlarının avive edilip re-epitelizasyon oluşması ile sağlamaktır. Miringoplastilerde TM'nin havada asılı olması nedeniyle epitelizasyonun göç edebileceği bir destek oluşturmak açısından temporal kas fasyası[13], kıkırdak, perikondrium ve allo-derm gibi çeşitli greftler kullanılmaktadır.[8,14] Her ne kadar TM perforasyonu kapatılmasında güncel cerrahi tekniklerin yüksek oranda başarılı olmasına karşın, perforasyon onarımı her zaman başarılı olmayabilir perforasyon düzelmeyip revizyon cerrahileri gerekmektedir.[7] Başarısızlığın altında yatan birçok sebep bulunmaktadır. Bunlar arasında östaki disfonksiyonu, mastoid havalanmanın yetersiz olması, greftin türü, cerrahın tecrübesi sayılabilir. Ayrıca reepitelizasyon sürecini zorlaştıran faktörler olan perforasyonun geniş olması, perfüzyonun az olduğu anterior kadran perforasyonları, cerrahide epitel hücre proliferasyon merkezini oluşturan malleus

boynundan kısmi rezeksiyon yapılması; hastanın immün yetmezlik, venöz staz, diabetes mellitusa sahip olması sayılabilir.[15–17]

Son yıllarda TM perforasyonu iyileşmesini güvenli ve etkili bir şekilde arttıracak maddelerin kullanımına yönelik bir arayış söz konusudur. Bunlar içerisinde hyaluronan[18–21], heparin[22–24], insülin[1], insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-2[25], epidermal büyüme faktörü[18,19,26,27], bazik fibroblast büyüme faktörü[28], fibroblast büyüme faktörü[29], keratinosit büyüme faktörü[29,30], trombosit kaynaklı büyüme faktörü[31], hepatosit büyüme faktörü[32], allantoin[33], dönüştürücü faktör α[15], hypericum perforatum[34], dexpanthenol[4], dönüştürücü büyüme faktörü β1[35,36], plaminojen aktivatör ve inhibitör molekülleri[37] deneysel hayvan modellerinde ve klinik çalışmalarda denenmiş materyallerdir. Bu maddelerin perforasyon iyileşmesinin çeşitli aşamalarında olumlu etki gösterdikleri raporlanmıştır.

TM perforasyonu iyileşmesini üzerine araştırılan maddelerin birçoğu esas olarak cilt yarası iyileşme sürecinden elde edilen olumlu deneyimlere dayanmaktadır. Güneydoğu Asya'da bulunan bir semender türü olan 'Tylototriton verrucosus'un derisinden elde edilen tylotoin peptidinin cilt yara iyileşmesi üzerine gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda yara iyileşme üzerinde destekleyici aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.[38] Bu etkisini keratinositlerin, vasküler endotelyal hücrelerin ve fibroblastların motilitesini ve proliferasyonunu doğrudan artırarak yara bölgesinde reepitelizasyon ve granülasyon dokusu oluşumu üzeriden gerçekleştirmektedir.[39–43] Bildiğimiz kadarıyla literatürde TM perforasyonu iyileşmesi üzerinde tylotoininin etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Biz de bu sonuçlardan yola çıkarak sıçan TM perforasyonu iyileşmesinde topikal tylotoin uygulamasının rejenere membranlardaki histopatolojik etkilerini araştırmayı amaçladık.

7. GENEL BİLGİLER

7.1. İNSAN KULAK EMBRİYOLOJİSİ, HİSTOLOJİSİ ve ANATOMİSİ

Her bölümü farklı embriyojenik kökenli bir dizi dokunun birbiriyle etkileşimleriyle oluşan kulak; dış, orta ve iç kulaktan oluşan bileşik bir yapıdır.[44] Ektoderm kaynaklı otik plakoddan iç kulak gelişirken; brankiyal ve faringeal poş, yarık ve arklar da kulak kepçesi (aurikula; pinna), dış kulak yolu (DKY) ve orta kulak yapılarından oluşmaktadır.

7.1.1 Aurikula ve Dış Kulak Yolu Embriyolojisi

Gestasyonun altıncı haftasında birinci brankial yarığın çevresinde altı auriküler tüberkül belirir ve bu oluşan yapılara His tepecikleri denir. Bu tüberkül yapıları birleşerek kulak kepçesini meydana getirir.[45] 20.haftada yetişkin görünümüne kavuşan kulak kepçesinin bölümlerinden olan tragus birinci birinci arktan kaynaklanırken; pinnanın geri kalan kısmı ikinci arkın beş his tepeciğinden gelişir. Gelişimin erken evresinde boyunda yer alan pinna; haftalar ilerledikçe daha laterale ve kraniyale göç eder.

DKY birinci brankiyal yarıktan kaynaklanır. Fetal gelişimin 16.haftasında ektoderm kaynaklı meatal plug, brankial yarığın altında oluşur. 28.haftada son halini alacak olan DKY kanalı, bu plugın rekanakize olmasıyla oluşur. Meatal plug TM'nın medialinden başlayarak, dışarı doğru ilerleyerek kemik kanalın da epitelyal iskeletini oluşturur.[45]

Timpanik membran, 3 germ yaprağından da köken alır. Dış epitel katmanı ektoderm kaynaklanırken; ortadaki fibröz katman mezodermden ve orta kulak kavitesine bakan iç mukozal yüzü ise endodermden gelişir.[45]

7.1.2.Orta Kulak Embriyolojisi

Orta kulak timpanik kavite, östaki tüpü, attik, antrum ve mastoid hücreleri içerir. Bu yapılar esas olarak birinci farengeal poştan kısmen de ikinci farengeal keseden köken alan tubotimpanik endodermden gelişiriler.[45] Malleus başı ve inkus gövdesi birinci brankial arkın (Meckel kıkırdağı) mezoderminden kaynaklanırken; stapes suprastrüktürü, incus uzun kolu

ve malleus manubriumu ise ikinci brankial ark (Reichter kıkırdağı) mezoderminden gelişir.[45,46] Bunlara ek olarak, annular ligament ve stapes tabanı otik kapsülden gelişir.[45]

7.1.3.İç Kulak Embriyolojisi

İç kulak embriyolojik olarak kemik ve membranöz labirent olarak iki kısımdan oluşmuştur. Gestasyonun 3.haftasında başlayan gelişim 16.haftada tamamlanır. Arka beyin tarafındaki ektoderm kalınlaşarak otik (işitsel) plakodu oluşturur. Gelişimin ilerleyen aşamasında otik plakod membranöz labirentin kaynağını oluşturacak olan otik veziküle (otik pit) dönüşür. Ektodermin bu farklılaşma aşamalarında FGF-3, Pax-2 ve Wnt sinyal yolakları görev alır.[47]

Otik vezikülün dorsalinden (pars inferior) utrikül ve semisürkiler kanallar; ventralinden (pars süperior) ise koklea ve sakkül yapıları gelişir.[45] Mezoderm kökenli kıkırdak bir yapı, membranöz labirentin etrafını sarar ve ileride ossifiye olarak kemik labirenti meydana getirir.[48]

7.1.4.Kulak Histolojisi:

Aurikulayı oluşturan elastik kıkırdak tabaka üzerindeki cilt ile sıkıca yapışmış halde bulunur. DKY aurikula ile TM arasında uzanan yassı bir kanaldır. Kanal derisinin epitheli çok katlı yassı özelliktedir. Submukoza tabakasında buluna serömüköz bezler kulak kiri olarak da bilinen buşon oluşumundan sorumludur. Ayrıca DKY'nin eksternal 1/3'lük kısmında bu tabakada kıl folikülleri ve yağ bezleri de izlenir.

Orta kulağı dış kulaktan ayıran TM'nin dış yüzeyi ince bir epitel tabakasından iç yüzeyi ise orta kulak boşluğunun epiteli olarak devam eden tek katlı kübik epitel ile örtülüdür. Pars tensada bu iki tabaka arasında fibröz tabaka bulunur iken pars flaksidada yoktur.

Timpanik kavite ve mastoid içerisinde goblet hücleri bulunan tek katlı küboidal mukoza epiteli ile döşelidir. Epitel östaki tüpüne doğru yalancı çok katlı siliyalı kolumnar epitele dönüşmeye başlar. Goblet hücreleri bu siliyalı epitel hücreleri ile ilişkilidir ve hücre

topluluğunun yakalaşık olarak %20'sini oluşturur.[49] Mukoza ile kemik arasında gevşek bağ dokusu vardır.

7.1.5. İnsan Kulak Anatomisi

Kulak anatomik olarak görevleri ve yapıları bakımından dış, orta ve iç kulak üç ana alt başlık altında incelenir. Dış kulak aurikula, DKY ve TM yapılarını içerirken orta kulak timpanik kavite, tuba östaki, attik ve antrum, mastoid hücrelerden oluşur. Kemik (koklea, vestibül, semisirküler kanallar) ve membranöz (koklear duktus, semisirküler duktuslar, utrikül, sakkül, endolenfatik kese ve duktus) labirent ise iç kulağın önemli yapılarıdır.

7.1.5.a Dış Kulak Anatomisi

Kulak kepçesi başın sagital ekseni ile 30 derecelik bir açı yapan, fibroelastik bir yapıdan meydana gelmiştir. Aurikülanın kavum konkası DKY'na doğru devamlılık gösterirken, süperiyorda bu kıkırdağın bütünlüğü sekteye uğrar. Aurikülanın heliksin krusu ve tragus arasında kalan bu bölgeye aurikuler çentik (insisura terminalis) adı verilir. İncisura terminaliste kıkırdağın bütünlüğünün aralıklı olması, bu alanın kulak ameliyatlarında transkanal yaklaşımlarda güvenli bir insizyon hattı olarak kullanılabilmesini sağlar.

Lobül, pinnanın kıkırdak içermeyen tek bölümüdür. Aurikülanın dış yüzey cildi kıkırdak yüzeyine sıkıca bağlı iken; iç yüzey cilt altı dokularına bağlı olarak daha hareketlidir. Üç adet ekstrinsik kası (anteriyor, posteriyor ve süperiyor auriküler kaslar) ve 3 adet ligament (anteriyor, posteriyor ve süperiyor ligamentler) ile 6 adet intrinsik kasa sahiptir.[46] Kulak kepçesi ve DKY'nun duyusal innervasyonu, 5, 7, ve 10. kranial ile 3. servikal sinir tarafından sağlanır. Arteriyel kanlanması ise eksternal karotis arterin dalları tarafından sağlanırken; venleri internal juguler vene drene olur. Parotis, retroauriküler ve yüzeyel servikal lenf nodları lenfatik drenajını sağlar.[46]

DKY erişkin bir insanda kemik (dış 1/3'lük bölüm) ve kıkırdak (iç 2/3'lük bölüm) kısım olmak üzere iki bölümden meydana gelir ve yaklaşık uzunluğu posterosüperiyorda 25 mm, anteroinferiyorda 30 mm kadardır. Bu ön ve arka duvar arasındaki uzunluk farkı TM'nin obliq bir yerleşim göstermesini açıklamaktadır. Ayrıca, çocuklarda kemik kısım gelişimini henüz tamamlamadığından dolayı, aurikülanın elastik kıkırdağının devamı olan

kıkırdak kısım görece daha uzundur. Kemik kısmın en dar yeri isthmus olarak adlandırılır. DKY kanalının kıkırdak kısmını saran deri sebase, serömüsinöz bezler ve kıl folikülleri içerirken; kemik bölümünü saran deri ise subkutan doku içermediğinden daha ince ve periosta sıkıca yapışıktır. DKY saat 12 yönünde cerrahi landmarkerlardan olan timpanosquamöz sütur; saat 9 hizasında da timpanomastoid sütur bulunur.[46] DKY'nin sensöriyal inervasyonu 5.,7. ve 10. kranial sinirler tarafından sağlanır. Arteriyel kanlanması internal maksiller arterin dalı olan derin auriküler arterle sağlanırken; venöz drenajı posteriyor aauriküler ve süperfisiyel temporal venlerle olur. DKY kemik kanalının tabanı timpanik kemik tarafından oluşturulur. Kanalın orta kısmından başlayarak aşağıya ve dışa mastoid apekse doğru ilerleyen, saat 9 hizasında yerleşim gösteren, timpanomastoid sütür yer alır.[46]

Orta kulak kavitesi ile dış meatal kanal arasında bulunan TM, havada asılı duran[50], obliq uzanımlı, yarı saydam, trilaminer yapıya sahip iç bükey şekilli eşsiz bir yapıdır.[51] Tm'nin havada asılı olması, TM perforasyonlarında iyileşme sürecinin yara dibi yerine perforasyonun kenarlarından başlamasını açıklamaktadır.[52–54] Pars tensa ve pars flaccida (shrapnell zarı) olarak iki kısımda incelenen TM'nin horizontal uzunluğu 8-9 mm vertikal uzunluğu 9-10 mm, kalınlığı ise yaklaşık 0.1 mm'dir.[45] Pars tensa TM'nın büyük bölümünü oluşturan, periferinde kalınlaşarak fibrokartilajenöz bir halka yapısı oluşturarak timpanik sulcusa oturur.[51] Bu yapı içerisindeki fibröz tabaka, TM'nin pars flaccidasının süperiyorunda yer alan Rivinus çentiği seviyesinde eksiktir.[51] TM pars tensada trilaminer yapıda iken pars flaccidada orta fibröz tabaka yoktur. Orta fibröz tabaka dizilim şekline göre üç tür lif içerir; malleus sapı çevresinde radial uzanım gösteren lifler fazla iken, dairesel ve parabolik uzanımlı lifler anulusa yakın TM bölgesinde daha sıktır.[51] TM pars tensanın orta bölgesinde manibrium malleinin uç kısmında içe doğru kıvrılarak umbo olarak ifade edilen yapıyı meydana getirir. TM'nin düz bir şeklinin olmaması zarın umbodan perifere doğru yayılan ışık konisini oluşturmasına sebep olur, klinik pratikte kulak zarı muayenelerinde önemli ipuçları veren bu hüzmeye Politzer üçgeni adı verilir. TM'nin sensöriyal sinirleri mediyal yüzde glossofarengeal sinir iken lateral yüzde trigeminus, vagus ve aurikülotemporal sinirdir. Beslenmesi stilomastoid ve timpanik arter tarafından olurken; venöz drenajı lateralde eksternal juguler vene, madialde pterigoid pleksusa olmaktadır.[55]

7.1.5.b Orta Kulak Anatomisi

Orta kulak yüzeyi mukoza ile kaplı, içerisi hava dolu yaklaşık hacmi 0.5 cm^3 olan boşluktur. Bu kavite nazofarenkse östaki tüpü ile, mastoid hava hücrelerine aditusla, iç kulağa ise oval ve yuvarlak pencere aracılığı ile bağlanır. Boşluk içerisinde dış ortamdaki ses dalgalarını iç kulağa ileten, malleus, incus ve stapes kemikçik kompleksi yerleşmiştir.

Orta kulak boşluğu timpanik anulusa göre bölümlere ayrılır. Anulusun üzerinde kalan kısma (pars flaccida ve attik lateral duvarının mediyali) epitimpanum, anulusun inferiorunda kalan kısma hipotimpanum, TM hizasında kalan bölüme mezotimpanum denir. Ayrıca östaki tüpü etrafındaki alan protimpanum denirken; fasiyal reses ve sinüs timpani bölgesine retrotimpanum da denilmektedir.[56]

Orta kulağın önemli anatomik yapılarla komşuluk yaptığı altı duvar tanımlanmıştır. Lateral duvarda skutum ve TM yer alır. Tavanı orta kafa çukuru ile komşuluğu olan tegmen timpani tarafından oluşturulurken, tabanda juguler bulbus ile hipotimpanumu ayıran ince kemik bir lamel tarafından sınırlanır. Ön duvar komşuluğunda internal karotis arterin çıkıntısı, tuba östakinin kemik bölümü ve tensör timpani kasının tendonu bulunur. Arka duvarda aditus ad antrum ile epitimpanumdan mastoid havalı hücrelere açılır. İçerisinde stapes kasının bulunduğu piramidal eminens de arka duvar komşuluğunda bulunur. Piramidal eminensin hemen posterior komşuluğunda, incusun kısa kolu yakınından da geçerek fasiyal sinir ikinci dirseğini yaparak vertikal segment olarak yoluna devam eder. Bu özelliği onu önemli bir anatomik landmark yapmaktadır. Piramidal eminens fasiyal reses ve sinüs timpaniyi mediyal- lateral eksende ikiye ayırırken, posterolateralinden seyrederek orta kulağa giren korda timpani ile de komşuluğa sahiptir. Orta kulak boşluğunun medial duvarının çoğunluğunu kokleanın bazal turu tarafından oluşturulan promontorium yapar. Ayrıca oval pencere, yuvarlak pencere, lateral semisürkiler kanal, fasiyal sinirin kanalı, sinüs timpani (subikulum ile pontikulus arasında kalan bölge) de medial duvarda yerlerini alır.

En büyük havalı hücre olan antrum, kulaktaki havalı boşlukların (squamöz, petröz ve mastoid kısımlar) en büyüğüdür ve orta kulağa açılır. Antrum üstte orta kafa çukurundan tegmen antri denilen ince kemik lamelle ayrılır. Antrum mastoidektomi cerrahisinde kortikal kemikte yer alan Macewen üçgenin[45] iz düşümü takip edilerek bulunabilir. Bazen mastoid

bölgeden antruma ulaşılmak isterken kemik bir septum yapısıyla karşılaşılır. Bu septum petrosquamöz lamina (korner septumu) olarak adlandırılırken; mastoid kemiği süperfisiyal ve derin olarak iki bölüme ayırır.

Orta kulak boşluğunda ses dalgalarının iletiminde görevli eklem tiplerine göre hakeret ekseni değişen üç adet kemikçik bulunur. TM'ye temas halinde bulunan malleus, en lateralde olanıdır ve baş, boyun, üç tane çıkınıtısı (manibrium, anteriyor ve lateral proçes) mevcuttur. Malleus başı incus gövdesi ile sellar tipte eklem yapar. İncusun uzun ve kısa olmak üzere iki kolu vardır. Uzun kolun distaline lentiküler proçes denir ve stapes başı ile sferoid tipte eklem yapar. Lentiküler proçes vasküler beslenmesi en az olan bölgedir ve perfüzyon bozukluğuna daha duyarlıdır. Kısa kol fossa incidusta yer alır ve fasiyal sinir ikinci dirsek alanına komşudur. Stapes kemikçik zincirde en sonda yer alır ve oval pencere ile sindesmos tipte eklem yaparak, sesin dış ve orta kulaktan iç kulağa iletilmesinde rol alır. Baş, boyun, ön ve arka bacak kısımlarından oluşmuştur. Stapes tabanı oval pencereye anuler ligamentle bağlanır.

Orta kulak kavitesi içerisinde tensör timpani ve stapes kası olarak isimlendirlen iki kas bulunur. Malleusun manibriumu ile origo yapan tensör timpani kası, TM ile temas halinde olup düşük frekanslı seslerin anlaşılmasında kulak zarının gerginliğini artırır. Fasial sinirin seyri sırasında birinci dirseğini yaptığı yer için mirengi noktası olan kokleiform proces ise, tensör timpani kasının sonlandığı anatomik bölgedir. Stapes kası piramidal eminensten başlayıp stapes kemiğinin boynuna tutunur. Bu kas yüksek sesle karşılaşan kulakta kasılarak stapes tabanının anteriyor kısmını laterale hareket ettirerek, kokleayı akustik hasara karşı koruyan önemli refleks mekanizmasında görevlidir.

Hem internal karotid hem de eksternal karotid sistem orta kulağın arteriyel kanlanmasında çok sayıda anastomoz yaparak rol oynar. Venöz drenaj süperior petrozal sinüse ve pterigoid pleksusa olur.[45]

7.1.5c İç Kulak Anatomisi

İşitme ve denge sistemini içeren iç kulak temporal kemiğin petröz kısmının derininde yer alır. Kavum timpani ile yuvarlak pencere ve oval pencere aracılığıyla ilişkili olup;

koklear ve vestibüler duktuslar yolu ile de kafa içi ile ilişkilidir. Kemik ve membranöz labirent olmak üzere iki bölümde incelenir.

Kemik labirent içerisinde Na+ konsatrasyonu yüksek, K+ dan fakir perilenf adı verilen sıvı ile doludur ve vestibül, semisiküler kanallar ve koklea olmak üzere 3 alt bölümde ele alınır[45]. Semisirküler kanallar, birbirlerine dik açılı düzelemlerle uzanan lateral, posterior ve süperior olmak üzere üç adet kanaldır. Her kanalın uç bölümlerine ampulla denir ve bağımsız olarak vestibülün posterosüperioruna açılırlar. Labirentin merkezinde olan vestibül ise internal akustik kanalın fundusu ile orta kulak kavitesinin medial duvarı arasında kalır.[45] Vestibülün lateral komşuluğunda oval pencere bulunurken; medial komşuluğunda vestibüler akuaduktus bulunur. Dura matere kadar uzanarak endolenfatik kanal olarak sonlanır.[45]

Koklea iç kulağın anteriorunda yerleşmiştir. Modiolus adı verilen, yaklaşık 42 mm uzunluğunda[57] merkezi bir kemik plakası etrafında 2.5 ile 2.75 tur atarak yerleşen kokleanın; skala media (ductus koklearis, membranöz koklea), skala timpani ve skala vestibüli olarak 3 bölümü vardır. Skala vestibüli üstte vestibüluma açılırken; skala timpani ise altta yuvarlak pencere ile sonlanır. Bu iki bölüm içerisinde perilenf sıvısı dolaşır ve kokleanın apeksinde birleşirler. Skala timpani perilenfi koklear akuaduktus aracılığıyla subaraknoid boşluktaki beyin omurilik sıvısı ile iştiraklıdır. Beyin omurilik sıvısı ve perilenf kaçağını tanımlamakta her iki sıvıda da bulunan β2 transferrin klinik hayatta önemli bir parametredir.

Membranöz labirent K^+'dan zengin sıvı olan endolenfin içinde dolaştığı; semisirküler duktus, utkikül, sakkül, koklear duktus, endolenfatik duktus ve keseden oluşur. Skala media olarak da isimlendirlen duktus koklearis, kokleanın apeksinde kör uçla sonlanırken duktus reuniens aracılığıyla sakkül ile bağlantılıdır. Ductus reuniens bu özelliğiyle işitme ile denge sıvısının karıştığı bir kanal olmasıyla önemlidir. Baziller membranın desteklediği korti organı koklear duktus içerisinde bulunur. Membranöz kokleayı skala vestibüliden ayıran yapı reissner zarıdır. Üç adet semisirküler duktus, aynı isme sahip kemik kanalın içerisinde ilerlerler ve utriküle açılırlar. Her üç kanalın genişlemiş şişkin uçlarına ampulla denir. Semisirküler duktuslar, denge duysunun algılanmasında rol alan kalınlaşmış nöroepitel çıkıntıya sahiptir. Bu çıkıntılar crista ampulla olarak isimlendirilmiştir. Vestibülün arka kısmında yer alan utrikül doğrusal hızlanma ve yavaşlamayı algılar. Utrikülün ön kısmında

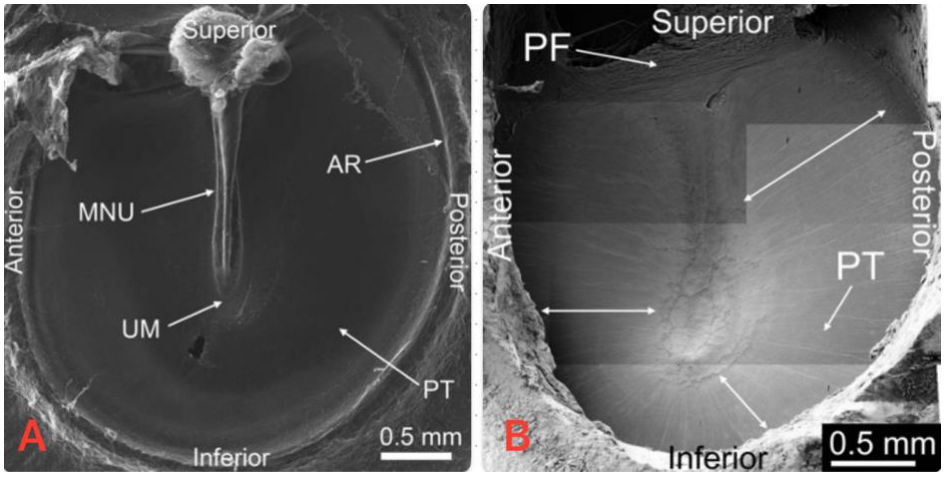
ve stapes tabanının karşısında yer alan sakkül ise vertikal planda hareketi algılar. Sakkül ve utrikülün duyusal epitellerine makula adı verilir. Endolenfatik kanal, sakkül ve utrikülden kaynaklanan iki kanalın birleşmesiyle oluşurak vestibüler akuaduktus içinden geçer. Bu kanalın terminali, petröz kemiğin arka yüzündeki iki dura yaprağı arasında yerleşmiş olup genişleyerek endolenfatik keseyi oluşturur. Endolenfatik kese endolenf basıncının yükseldiği meniere hastalığında drenaj veya şant cerrahisinde eksplore edilen önemli bir yapıdır.[45]

7.2 RAT KULAK ANATOMİSİ

7.2.1. Rat Dış Kulak Anatomisi

Rat kulağının, dış görünüşteki farklılıkların yanı sıra insan kulağından önemli ayrımları bulunur. Dış kulak anatomisi, aurikula, DKY, timpanik membran olarak üç başlık altında incelenir. Aurikula ince elastik bir kıkırdağın üzerini örten, kısa tüylerle kaplı ve deriye sıkıca yapışık koni şeklinde oluşmuştur. İnsan kulak kepçesinden farklı olarak yağ içeren lobül yapısı yoktur.[58] DKY kıkırdak ve kemik bölümden oluşur. Kıkırdak bölüm skuamöz ve oksipital kemikler arasında, kafatasının her iki yanında yarı gömülü durumda bulunan timpanik bullalara bağlıdır. DKY'nun çapı eksternal akustik meatusta en genişken, kemik halkanın medialdeki kemik ile birleştiği alan en dar kısımdır.

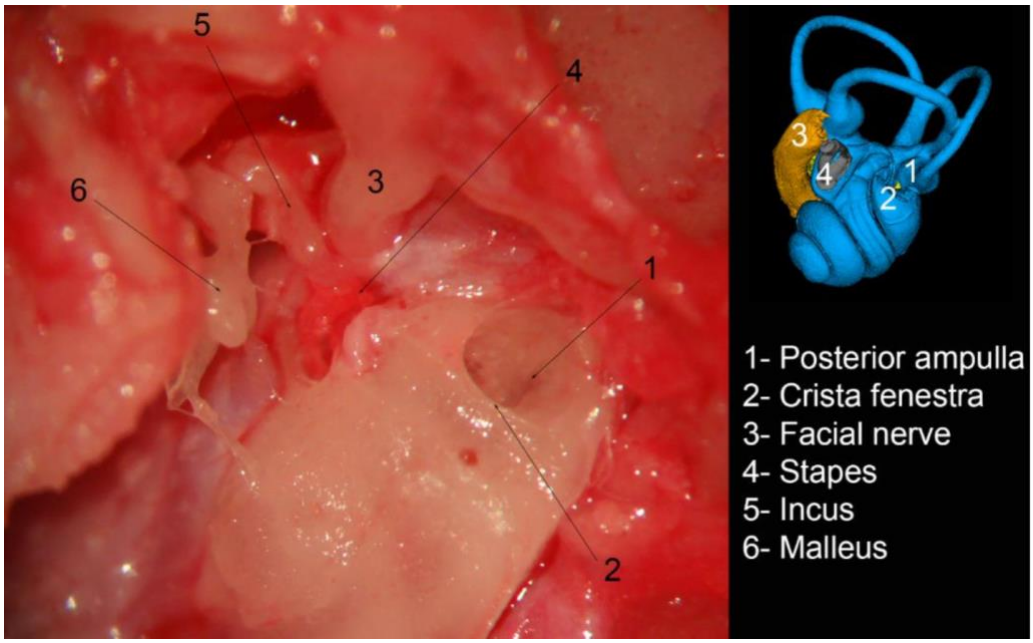
Timpanik bullanın konik şekli kaynaklı kanalda oluşan ölü boşluk, DKY'den bakıldığında TM'nin tamamına görüş sağlanmasını engeller. Sıçan TM'si 11mm^2 yüzey alanına sahiptir.[59] Lu ve ark.[60] yüksek çözünürlüklü taramalı bir elektron mikroskobu ile yaptıkları çalışmada, sıçanların TM pars tensasındaki lif düzenini incelemişlerdir. Bu çalışmada, pars tensadaki fibrillerin yaklaşık 25 nm çapında olduğunu ortaya koymakla birlikte; bu fibrillerin tıpkı diğer memelilerde de bildirildiği gibi radyal, dairesel, parabolik ve oblik lifler olarak gruplandırılabileceğini göstermişlerdir.[60]



Şekil 1 *(1a ve 1b): Rat timpanik membranının taramalı elektron mikroskobu altında görüntüsü: Sıçan sağ timpanik membranının SEM görüntüsü (1a) AR= Anüler halka; MNU= Manibrium; PT= Pars tensa; UM= Umbo. Sıçan TM'nın DKY tarafından bakıştaki SEM görüntüsü(1b) Çift başlı ok işareti, pars tensadaki farklı konumlarda radyal lif uzanımını göstermektedir, PF= Pars flaccida. (Liu J, Agrawal SK, Ladak HM, Wan W. Fiber Arrangement in the Rat Tympanic Membrane. Anat Rec (Hoboken). 2016;299(11):1531-1539.*

7.2.2. Rat Orta Kulak Anatomisi

Albino sıçanların orta kulak yapısı, boyutları çok daha küçük olmakla birlikte insanlarınkiyle oldukça benzerdir. Ratların orta kulak hacmi insanlarınkinin yaklaşık dörtte biri kadardır.[58] Birçok memeli kulağında tanımlandığı gibi, orta kulak boşluğu epitimpanum, mezotimpanum ve hipotimpanum olarak üç bölüme ayrılmıştır.[61] Kemikçik zincir orta kulak kavitesinin epitimpanumunda yer almakla birlikte malleus başı en nazalde, incusun kısa çıkıntısı ise en oksipitalde yerleşmiştir. Timpanik bulla ventral yerleşimlidir ve hipotimpanumun büyük bölümünü kaplar.[61] Hipotimpanumun medial duvarını promontoryum yapar.[61] Promontoryumun süperiyorunda, mezotimpanuma doğru oval pencere yer alır.[61] İnsanlardaki gibi oval pencereye stapes yerleşmiştir ve iki bacağının arasından stapedial arter geçer.[61] Fakat insanlarda stapedial arter fetal dönemden kalan bir damarken; sıçanlarda bu vasküler yapı internal karotis arterin dalıdır.[61] Bu damarın anatomik konumu ve hayati önem taşıyan karotis arterin dalı olması sebebiyle; sıçan kulağı stapes ve kemikçik rekonstrüksiyonunu içeren ossiküloplasti cerrahileri için uygun bir deney modeli değildir.[62] Ayrıca insanlarla mukayese edildiğinde sıçanların fasiyal siniri daha yüzeyel seyir halindedir.[62]



Şekil 2: *Rat kemikçik zincir, fasiyal sinir mikroskop ve kokleanın grafik görüntüsü (Hitier M, Sato G, Zhang YF, et al. Anatomy and surgical approach of rat's vestibular sensors and nerves. J Neurosci Methods. 2016;270:1-8)*

7.2.3. Rat İç Kulak Anatomisi

Koklea sıçan timpanik bullasında yer alan en önemli yapıdır ve hayvan modellerinde mikrodiseksiyon ile anatomik yapıları ortaya koyulmaya çalışılmıştır. İnsan kokleası 2.5 ile 2.75 tur atarken; sıçan kokleası 2.5 tura sahiptir.[62] Kobay ve sıçanların koklealarında da tıpkı insanlardaki gibi tektoriyal membran, reissner membranı ve korti organı yapıları tanımlanmıştır.[62] Ratların kokleaları 12 mm uzunluğunda olup; skala vestibüli, skala timpani ve skala media olmak üç bölümde incelenmiştir. Orta kulak ve iç kulağın bağlantısı yuvarlak pencere ve oval pencere ile olmaktadır. Skala vestibüli ve skala timpani içerisinde perilenf sıvısı dolaşır ve bu yapılar apikalde birleşerek sonlanır. Reissner membranı endolenfatik ve perilenfatik iki yüze sahiptir. Sıçanlarda da sakkül ve utrikül yapısı bulunmakla birlikte sakkül kokleanın ikinci bazal dönüşünün yakınında yerleşmiştir.[62] İnsanlarda olduğu gibi sıçanlar da üç yarım daire kanalına sahiptir ve her biri kabaca birbirine diktir.[63,64]

7.3 CİLT YARASI VE İYİLEŞME MEKANİZMASI

Derinin primer işlevi organizmayı çevreye karşı korumaktır. Cilt yüzey alanının büyük kısmının kaybı ile sonuçlanan hastalıklar ve yaralanmalar önemli sakatlıklara hatta ölüme sebep olabilir. Bu yüzden cildin iyileşme sürecini anlamak dolayısıyla araştırmamızın da amacı olan TM perforasyonlarında iyileşme sürecini ortaya koyabilmek açısından önemlidir. Çeşitli dokuların ve hücreler arasındaki karmaşık fakat iyi organize edilmiş etkileşimle ilerleyen yara iyileşmesi, temelde süreklilik arz eden üç fazdan oluşur ve bunlar; inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme fazlarıdır.[65] Bu fazların başlaması, devam etmesi ve birbirleri arasındaki geçişlerin sağlanmasında çok sayıda sitokin, büyüme faktörü ve proteazın görev aldığı yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur.

7.3.1 İnflamasyon Fazı

Doku hasarı sonrasında vasküler geçirgenlik artar ve bir dizi olay meydana gelir. Yara yerine dolaşımdaki hücrelerin göçü, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin lokal salınımı ve olay yerine gelen hücrelerin aktivasyonu ile karakterize olan fazdır. İnflamatuar yanıtın oluşmasını, hali hazırda oluşturulmuş inflamatuar aracıların (esas olarak trombosit granülleri, mast hücreleri ve periferik sinir uçlarından salınan) veya yeni sentezlenen eikosanoidler ve trombosit aktive edici faktör (PAF) etkisiyle oluşur.[66] Vaskuler yaralanma

sonrasında subepitelyal kollajenin trombositlerle karşılaşması agregasyon ve koagülasyon kaskadını aktive eder. Bu karşılaşma ile trombin, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, dönüştürücü büyüme faktör-β (TGF-β), serotonin ve trombosit aktive edici faktör gibi maddelerin salınımına sebep olur. Yara bölgesine ilk göç eden ve en fazla miktarda bulunan nötrofillerin yanı sıra makrofajlar, fibroblastlar, monositler gibi immun sistemde rol alan hücreler de doku artıklarını temizlemek, hücre çoğalmasını ateşlemek ve antimikrobiyal savunmayı desteklemek için olay yerine gelirler.[67] Yara bölgesindeki endotel hücreleri tarafından ilk tanınan hücreler olan nötrofillerin süreçteki temel işlevi olası mikroorganizmaları fagosite etmektir.[68] İyileşmenin ikinci ile beşinci günleri arasında ortaya çıkan, bir sonraki hücre grubu olan monosit türevi makrofajların ise inflamasyon fazının en kritik hücreleri olduğunu bildirilmiştir.[69] Nötrofiller mikroorganizmaları fagozomlarında işleyip peptitlerini majör histo uyumluluk kompleksi (MHC) ile yardımcı T hücrelerine (T_h) sunarak doğal ve edinilmiş bağışıklık arasında bir bağlantı kurulmasına öncülük yapar. Ayrıca bu T_h hücreleri görevini tamamlayan nötrofilleri ortadan kaldırırlar.[70] Lokal üretilen fibrinöz trombüs dolaşım bileşenlerinin hücresel aralıktaki kaybını önlediği gibi onarım sürecinde görev alan bu hücrelere ön iskele (matriks) görevi görür.[71,72]

Trombositlerden kısa süreli faktör salınımıyla makrofajlar ilk ve güçlü bir şekilde uyarılır ve aktive olur. Aktive olan trombositlerin granüllerinden TGF-β ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) büyüme faktörleri, CATP-3 gibi kemokinler ve fibrinojen, fibronektin ve tromboplastin gibi protoinler salınır.[71] Makrofajlar hücresel artıkların fagositozu, matriks sentezi, anjiyogenez ve fibroplazi gibi iyileşme sürecinin çeşitli aşamalarında temel görevlere sahiptir.[73]

7.3.2 Proliferasyon Fazı

Reepitelizasyon ve granulasyon dokusu oluşumu bu fazdaki temel aşamalardır.[38] Bu aşamaların primer hücreleri fibroblastlardır ve esas olarak aktive olmuş makrofajlardan salınan büyüme faktörleri ve kemokinlerce aktive edilirler.[71] Fibroblastlar kadar endotel hücreleri ve keratinositlerin yara yerine göçü de, yoğun hücresel aktivitenin meydana geldiği proliferasyon fazı için oldukça önemlidir.[74] Yara yerine göç eden fibroblastlar, olay yerinin yakınındaki sağlam venüllerden endotel hücrelerinin çoğalmasını indükler.[74] Böylece anjiyogenez süreci başlar ve granulasyon dokusunda yeni dolaşım ağı tesis edilir.

Neovaskülarizasyon, fibroplazi olarak adlandırılan yara bölgesinde fibroblastların yeni kollajen üretmesi ve hücre dışı matriksin güçlü bir bağ dokuya dönüşmesi için önemlidir.[71]

Her cilt yaralanması hasar bölgesinde doku hacminin ve kütlesinin kaybına sebep olur ve iyileşme esnasında bu yara yatağının doldurulması ihtiyacını doğurur. Bunun gerçekleşmesi araştırmacılar tarafından iki farklı şekilde açıklanmıştır. İlkinde yara bölgesinin anatomik yapısının, yara kenarlarından fibroblast, epitel ve keratinosit hücrelerinin göçü ve çoğalması için uyarıcı etki oluşturması üzerinde durulmuştur. Montesano ve Orci[75] de bu görüşten yola çıkarak, yara yerine yakın bazal hücrelerin, komşu hücrelerle etkileşimlerini kaybettiklerinde aktive olduklarını, mitotik özellikler kazanıp lezyonun merkezine doğru çoğalırdıklarını bildirmişlerdir ve bu olaylar silsilesini "serbest komşu etkileri" olarak adlandırmışlardır. Peacock[76] tarafından sunulan ikinci görüşte ise, yara alanı granülasyon dokusu ile dolsa bile, yara kenarları görünmeyen bir çekim kuvveti varmışçasına birbirlerine doğru hareket ederler. Bu çekimin de bazı fibroblastların kasılabilme özelliğine sahip miyofibroblastlara farklılaşmasından kaynaklandığını savunmuştur.

Anjiyonegenez granülasyon dokusu oluşumunun devamı açısından önemlidir. İyileşmenin ilk üç gününde yeni damarların oluşumu açısından gerekli zemin temel fibroblast büyüme faktörü tarafından sağlanırken; dördüncü ve yedinci günlerde VEGF salınımı daha kritiktir.[77]

Makrofaj ve fibroblastların yara yerine göçü ve aktivasyonu, neovaskülerizasyon varlığıyla, yeni hücre dışı matriks bileşenlerinin esas olarak bu hücrelerce üretilmesini sağlar. Onarımın ilk aşamalarında matrikste, fibroblastlar tarafından üretilen fibronektin ve sülfatlanmamış bir glikozaminoglikan olan hyaluronik asit baskındır. Fibronektin ve hyaluran yara yerindeki hücrelerin hareketi için etkili bir mikro ortamı sağlar.[71] İyileşme süresince en çok fenotip değişikliğine uğrayan fibroblastların fazla miktarda sentezledikleri kollajen, yara izi oluşumunda ana bileşeni oluşturur.[71] Makrofajlarca salınan TGF-β ve PDGF ile fibroblastlar fenotipik olarak a-düz kas aktin (aSMA) taşıyan miyofibroblastlara dönüşür. Miyofibroblastlar kendilerini hücre dışı matriks (ECM) sınırı boyunca hizalayarak daraltıcı bir kuvvet oluşturur ve yaranın kapanmasını kolaylaştırır.[65]

7.3.3 Yeniden Şekillenme Fazı

Temelde iyileşmenin bu fazı, kollajen fibril üretimi ve alt tipleri arasında dönüşümünü, sindirimini ve oryantasyonunu içerir. Klinik olarak bakıldığında, onarımın en önemli aşamasıdır; çünkü matriks birikiminin kalitesi, hızı ve miktarı iyileşme dokusunun gücünü belirler. Onarım sürecini kötü etkileyen sebepler değişkenlik gösterse de, klinik olarak iyileşme eksikliklerinin genellikle zayıf kollajen birikimiyle ilişkilendirilmesi bu görüşü destekler niteliktedir.[74]

İyileşmenin onuncu gününde cilt yara yatağı tamamen granülasyon ile dolmuştur.[78] Matriks oluşumu için neovaskülarizasyonun ve granülasyon dokusunun ortadan kaldırılması gerekmektedir. Bu sebeple granülasyon dokusunun yerini kollajen ve elastin liflerden oluşan bir iskelet alır.[65] Bu iskelet ilerleyen aşamalarda proteoglikanlar ve glikoproteinler tarafından güçlendirilir.[65] Yeni kollajen sentezini içeren yeniden şekillenme aşamasının nihai sonucu TGF-β'nin aracılık ettiği skar oluşumudur.[65] Yara yatağındaki granülasyon dokusundan skara geçiş, kollajenin sürekli sentez ve yıkımını içeren metabolizmasına bağlıdır[65]. Kollajen lizisi, fibroblastlar, makrofajlar, epidermal ve endotelyal hücrelerce salınan çeşitli maktriks metalloproteinazları tarafından kontrol edilir.[65]

Miyofibroblastların yara yatağının kontraksiyonunda kilit rolü olmasının yanı sıra hücre dışı matriks proteinlerinin metabolizmasını da kontrol eder.[39] Bu kompleks süreç, TGF-β, interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) gibi büyüme faktörleri, kemokinler ve sitokinleri içeren karmaşık bir sinyal ağı tarafından yönetilir.[79]

Sonuçta özetlemek gerekirse, yeniden şekillenme evresinin temelini oluşturan kollejen başlarda rastgele birikir, proliferasyon fazında oluşturulan fibronektin iskele etrafında organize olur ve yaraya sebep olan stresin doğasına ve yönüne göre değişkenlik gösterir. Rastgele oluşan kollejen ağı sonraları kollajenaz tarafından sindirilir. Kolajenin yeniden sentezlenmesi, yeniden yönlendirilmesi ve yeniden organize olmasını içeren birbirini izleyen ve tekrarlayan bu süreç, yara skarının daha düzenli konfigürasyonu ile sonuçlanır.

7.3.4 Yara İyileşmesinde Büyüme Faktörlerinin, Sitokinlerin ve Kemokinlerin Rolü

Yara iyileşmesi, cildin bariyer görevini sürdürmesini amaçlayan, oldukça karmaşık ve sürekli devam eden anabolik ve katobolik olayları içerisinde barındıran bir süreçtir. Bu süreçte keratinosit, fibroblast, makrofajlar, endotelyal hücreler ve trombosit gibi birçok hücre, özgün görevleri ve birbirini etkileyen olaylar zincirleri bakımından oldukça önemlidir. Bu hücrelerin yara yerine göçü, infiltrasyonu, proliferasyonu ve fenotip değişimleri ile inflamatuar yanıtın başlaması, yeni protein sentezleri ve sonunda onarımın tamamlanmasını ile sonuçlanmaktadır. Bu kompleks süreç, çok sayıda büyüme faktörü, sitokin ve kemokin içeren karışık bir sinyal ağı tarafından yönetilir. Bunlar içerisinde özellikle EGF ailesi, TGF-β ailesi, FGF ailesi, PDGF, VEGF, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF), interlökin (IL) ailesi ve tümör nekroz faktörü-a ailesi önemlidir. Güncel tıbbi yaklaşımda kullanılan üç büyüme faktörü vardır ve bunlar PDGF-BB, bFGF ve GM-CSF'tir. İçlerinde sadece PDGF-BB Amerika Birleşik Devletler'inde randomize klinik çalışmaları başarıyla tamamlamıştır.[79]

Yara iyileşmesi, inflamasyon, granülasyon dokusu oluşumu, reepitelizasyon, matriks oluşumu ve yeniden şekillenmeyi içeren ve birbiriyle örtüşen aşamaları içeren karmaşık bir süreçtir. Yaralanmayla bozulan cilt bariyerinde, hasara karşı ilk sinyal keratinositlerde depo halde bulunan IL-1 tarafından oluşturulur.[79] Doku hasarıyla pıhtılaşma kaskadı aktive olur, oluşan trombüs inflamatuar hücrelerin kemotaksisi için daha sonra yıkılacak olan matriksi sağlar. Trombositlerdeki alfa granüllerinden PDGF, EGF ve TGF-β salınır. FDGF, IL-1, Il-6, TNF-α gibi proinflamatuar sitokinler bakteriyel kontaminasyonun engellenmesi için nötrofilleri bölgeye yönlendirir. TGF-β uyarısıyla monositler makrofajlara dönüşür. Makrofajlar granülasyon oluşumunu başlatır ve IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuar sitokinleri ve FGF, PDGF, TGF-β, EGF gibi büyüme faktörlerini salgılar. Trombositlerce salınan FGF ve VEGF ile endotel hücreleri çoğalır ve neoanjiyogenez oluşur. TGF-β ve PDGF tarafından uyarılan fibroblastlar myofibroblast fenotipine kavuşur ve ECM sınırında dizilerek yara alanını daraltarak kapanmayı kolaylaştırcı etkisini gösterir.

Reepitelizasyon süreci yaralanma sonrası saatler içinde başlar ve FGF, TNF-α ve EGF epitel çoğalmasını uyarmak için ortama salınır. Reepitelizasyonda keratinositler geçici olarak yapılan ECM üzerine göç eder. Yara alanı kapandığında yani tamamen epitelize

olduğunda, keratinositler cilt bariyerini eski haline getirmek üzere farklılaşmayı başlatır. Kalıcı matriks oluşumu için revaskülarizasyon ve granülasyon dokusunun hali hazırda süreçlerden geçen yara yerinden uzaklaştırılması gerekir. Granülasyon dokusu yıkılması ve yerine kollajen ve elastin lilflerden oluşan iskeletin gelmesi yeniden şekillenme evresinin ana olaylarıdır. Bu iskelet üretien glikoproteinler ve hyaluran gibi glikozaminoglikanlarca sağlamlaştırılır. Takiben PDGF ile eski kollajenin yıkılıp; TGF-β etkisiyle yeni kollajen oluşumuyla yara dokusunun yeniden şekillenmesi olur. Tip 3 kollajen lifleri sağlam deride bulunan daha dirençli Tip 1 kollajene dönüştürülür.[80] Sonuçta da skar dokusu meydana gelir.

Epidermal büyüme faktörü ailesi yara iyileşmesinde en iyi açıklanabilen büyüme faktörü gurubur. Tirozin kinaz reseptörleri üzerinden etkisini gösterir. İlk olarak Dr. Stanley Cohen tarafından literatüre katılmıştır.[81,82] EGF reseptörlerinin aktivasyonu in-vitro çalışmalarda keratinosit proliferasyonunu ve kemotaksisini arttırdığı gösterilmiştir.[83–85,85] Keratinositler için güçlü mitojen etkiye sahip EGF, trombositler, makrofajlar ve fibroblastlardan salgılanır. Reepitelizasyonu önemli derecede hızlandırdığı[86] ve yara gerim kuvvetini arttırdığı gösterilmiştir.[87] TGF-α fibroblast, makrofaj, keratinosit, trombosit, lenfositlerden salınır. İn-vitro çalışmalarda keratinosit göçünü[88] ve proliferasyonunu[89] arttırdığı bildirilmiştir. İn-vivo çalışmalar ise kısmi kalınlıktaki yaranın epitelizasyonunun erken uyarılması ve sürdürülmesinde görevi olduğunu; fakat onarım sürecinde yokluğunda iyileşmeyi engellemediği gösterilmiştir.[90] EGF-HB kerotinositler tarafından salgılanıp[91], EGF reseptörünün alt tipleri olan HER1 ve HER4'e bağlanarak[92] reepitelizasyonu teşvik ettiği görülmüştür.

Fibroblast büyüme faktörü ailesinin cilt yaralarında rol alan üç üyesi ise FGF-2, FGF-7 ve FGF-10'dur. Tirozin kinaz reseptörleri tarafından etkilerini gösterir. FGF'ler fibroblastlar, endotel hücreleri, keratinositler, düz kas hücreleri, kondrositler ve mast hücrelerince üretilir. FGF-2 (temel FGF) ECM metabolizmasını düzenlediği, reepitelizasyon esnasında keratinosit hareketliliğini arttırdığı[93] ve fibroblastlardan kollejenaz üretimini uyardığı ve fibroblastların göçünü indüklediği çalışmalarla ortaya konulmuştur.[94] Bir başka çalışmada FGF-2 seviyelerinin kronik yaralarda azaldığı gösterilmiştir. FGF-7 diğer ismiyle keratinosit büyüme faktörü-1 (KGF-1) ve FGF-10 homoloğu olan keratinosit büyüme faktörü-2, FGF ailesinin diğer üyelerinden olup, in-vitro

çalışmalarda keratinosit proliferasyonunu ve göçünü uyararak reepitelizasyon üzerindeki olumlu etkileri gösterilmiştir. Ayrıca yara yerinde keratinosit apoptozunu indükleyerek reepitelizasyona katkı sağladığı gösterilmiştir.[95] FGF-7'nin VEGF'in yukarı regülasyonuna yardımcı olmasının yanı sıra neovaskülerizasyonda görevli ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü üretmeleri için endotel hücrelerini uyarır.[96]

Dönüştürücü büyüme faktörü β aile üyelerinden TGF-β-1 kutanöz yara iyileşmesinde önemlidir. Makrofajlar, tombositler, keratinositler ve fibroblastlar tarafından salınırlar.[97] İnflamatuar hücrelerin alınmasını kolaylaştırır. İn-vitro makrofajların süper oksit üretimini devre dışı bıraktığı ve sağlıklı dokunun korunmasını yardımcı olduğu gösterilmiştir.[98] ECM oluşumunu indükleyen genlerin eskpresyonunu artırarak granülasyon oluşumunun başlamasında önemli etkileri vardır.[99] Damar oluşumunu uyaran VEGF in yukarı regülasyonunu artırır.[100] Yine yara yerinde myofibroblast kasılmasını kolaştırır.[101] Matriks oluşumu ve yeniden şekillenme fazında, tip 1 ve tip 3 kollajen üretiminde rol oynar. Kollajen yıkımından sorumlu metalloprotinaz MMP-1, MMP-3 ve MMP-9'u inhibe ederek; metalloproteinaz TIMP-1 sentezinin doku inhibitörünü destekleyerek kollajen katobolizmasını inhiber eder.[99] Yani kollajen yıkımını azaltarak ve kollajen üretimini arttırarak keloid gibi anormal iyileşme sürecine sebep olabilir.[102] Yine keloid gibi hipertrofik skar oluşumunda rol oynayan CTFG'yi uyarması kötü iyileşmeyle ilişkisini ortaya koyar.[103] Yanık yaralarında TGF-β'nin artışı yeniden şekillenmeyi engellediği ve fibrozisi arttırdığı gösterilmiştir.[104] Diğer izoformları olan TGF-β-2 ve TGF-β-3'ün de yara iyileşmesinde rollerinin olduğu gösterilmiştir. TGF-β-2 tıpkı TGF-β-1 gibi kollajen birikimini artırarak skar oluşumuna sebep olurken[105]; TGF-β-3'ün skar oluşumunu engellediği ve daha iyi kollajen organizasyonunu sağladığı bildirilmiştir.[106]

Aktivin ve kemik morfojenik proteinler TGF-β süper ailesinin bir üyesi olup, yara iyileşmesinde olumlu etkilerini serin/treonin kinaz sinyal yolağı üzerinden gösterirler. Aktivin dermal fibroblast büyüme faktörlerini artırarak dolaylı olarak keratinosit proliferasyonunu artırırken[107]; bu hücrelerle doğrudan etkileşimi proliferasyonun inhibisyonu[108] şeklindedir. BMP'lerin alt üyelerinden özellikle BMP-6 yenilenen keratinositlerde ve onarımın erken dönemindeki fibroblastlarda yüksek oranda eksperese

edilmiştir.[108] BMP-6 yara iyileşmesi tamamlandığında yeniden yapılan epidermisin suprabazal tabakasında birikir.

Trombosit kaynaklı büyüme faktörlerinin kaynağı trombositler, vasküler endotelyum, makrofajlar, fibroblastlar ve keratinositlerdir.[109] Etkilerini tirozin kinaz reseptörleri üzerinden gösterirler. PDGF'ler yara onarımının her aşamasında görev alır.

Makrofaj, nötrofil, fibroblast sayısını artırır ve yara bölgesine göçünü teşvik eder. TGF-β gibi PDGF de makrofaj aracılı doku debritmanını ve granülasyon dokusu oluşumunu arttırır.[110] PDGF anjiogenezde, perisit hücrelerini kapiller yatağa çeker ve kılcalların yapısal bütünlüğünü destekler.[111] Bu olumlu etkilerine nazaran, in-vivo çalışmalar anjioyojenik etkinin FGF ve VEGF'den daha güçlü olmadığını ve yara yerinde ilk vaskülarizasyon için PDGF'nin olmazsa olmaz olmadığını göstermiştir. PDGF'nin in-vitro olarak trombospondin-1 ve insülin benzeri büyüme faktörünü artırıp reepitelizasyon sürecini desteklediği bildirilmiştir.[112] Yeniden şekillenme evresinde matriks metalloproteinazlarını yukarı yönlü regüle edip eski kollajenin lizisine yardımcı olur. Diyabetik yaralarda, peptik ülser tedavisinde de kullanılan rekombinant insan varyantı PDGF-BB (Becaplermin), kronik yara tedavisi için Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tek ilaçtır. PDGF'nin gen iletiminin kronik yarası olan hastalarda güvenli ve başarılı şekilde kullanılabileceğini bildirenler Margolis ve ark.[113] olmuştur.

Vasküler endotelyal büyüme faktörü ailesi üyeleri VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasenta büyüme faktörü (PLGF) şeklindedir. VEGF-A makrofajlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, keratinositler, fibroblast ve nötrofiller tarafından üretilir. Tirozin kinaz sinyal yolağı üzerinden etkilerini gösterir. Flt-1 (VEGFR-1) ve KDR (VEGFR-2) şeklinde isimlendirlen bağlandığı iki reseptörü vardır. Reseptörlerin bulunduğu hücrelere göre iyileşmenin farklı aşamalarında katkıları vardır. KDR entodel hücrelerinin göçünü ve proliferasyonunda yardımcı iken[114], Flt-1 vaskülerizasyonun organizasyonunu sağlamada etkilidir.[115] Makrofajlar yara onarımı sırasında VEGF-A salgılarken, fibroblast ve keratinositlerden salınan TNF-α, VEGF-A ekspresyonunu indükler. VEGF aile üyelerinden olan VEGF-C'nin VEGF reseptörü-3'e; PLGF'nin de VEGF reseptörü-1'e

bağlanarak iyileşmenin inflamasyon aşamasında, lenfatik sistem üzerinde olumlu etkileri gösterilmiştir.

Bağ dokusu büyüme faktörü direk integrinlere bağlanan ECM ile ilişkili heparin bağlayıcı bir proteindir. Fibroblastlar tarafından salınan CTGF onarım sırasında granülasyon dokusu birikimi, reepitelizasyon aşaması ve matriks oluşumu ve yeniden şekillenme aşamasında görev alır.[116]

Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör keratinosit proliferasyonunu arttırarak iyileşmenin reepitelizasyon aşamasına olumlu katkıları bildirilmiş olup, in-vitro çalışmalar GM-CSF'nin keratinositler üzerindeki etkisini doğrudan ve IL-6'yı arttırarak yaptığı öne sürmektedir.[117]

Proinflamatuar sitokinler içerisinde IL-1, IL-6 ve TNF-α yara işileşmesinde rol almaktadır. IL-1 nötrofiller, makrofajlar, monositler ve keratinositler tarafından üretilir ve parakrin etkilerinin yanı sıra otokrin etkileriyle keratinosit göçü ve proliferasyonunu artırır. IL-1 aktive ettikleri fibroblastlardan FGF-7 saılınımını arttırır. IL-6 monosit ve nötrofillerden kaynaklanır. Mitojenik ve proliferatif etkilerini keratinositler üzerinde gösterirken, nötrofillerde kemoatraktif etkisi ön plandadır. TNF-α, FGF-7 sentezini indükleyebilse de tek başına yüksek seviyelerde bulunması iyileşme sürecine zararlı etkiye sahiptir. Benzer etkilere sahip IL-1b, TNF-α ile birbirlerinin etkilerini güçlendirir. Her ikisinin de seviyeleri iyileşmeyen yaralarda artmış olarak bulunmuştur.[118]

Kemokinler iyileşme sürecinin aktif katılımcıları olup, hücreler üzerinde bulunan reseptörleri aracılığıyla reepitelizasyon, yeniden şekillenme ve anjiyogenez süreçlerinde katkıda bulunurlar.[95] CXC, CC ve C ligand aileleri kemokin grupları için tanımlanmıştır. Makrofaj kemoatraktan proteini (MCP-1), CC ailesine ait bir kemokindir. Yapılan in-vivo fare modeli çalışmalarında MCP-1 eksikliği reepitelizasyonu, anjiyogenezi ve kollajen sentezini geciktirerek yara iyileşmesini geciktirdiği gösterilmiştir.[119] İnterferon indüklenebilir protein 10 (IP-10), CXC ailesine aittir. IP-10'un reepitelizasyonu geciktirmesi, granülasyon fazını uzatması gibi etkileri iyileşme üzerine olumsuz etkilerinin olduğunu göstermektedir. Belperio ve ark.[120] yaptıkları bir çalışmada, IP-10'un EGF

salınımını ve EGF-HB reseptörünü inhibe ederek fibroblast göçünü engellediğini ayrıca anjiyogenezi de baskıladığını bildirmişlerdir. IL-8, CXC ailesinin üyesi olup onarım bölgesinde ekspresyonun arttığı, keratinosit migrasyonunu ve proliferasyonunu arttırarak reepitelizasyon aşamasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir.[121]

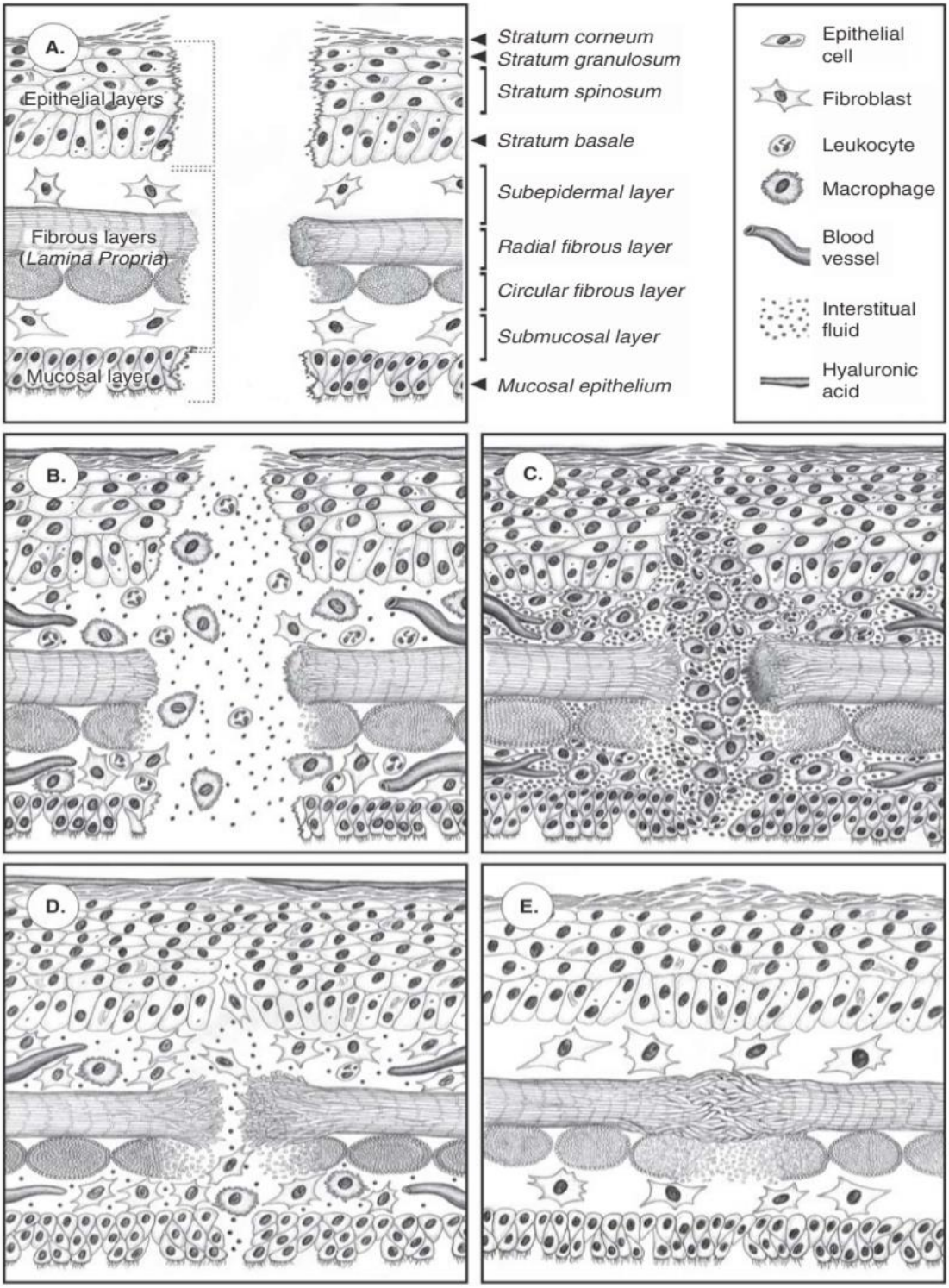
7.4 TİMPANİK MEMBRAN PERFORASYONU İYİLEŞME MEKANİZMASI

TM, dışta keratinositleri içeren çok katlı yassı epitel tabaka; ortada fibroblastlardan tip II ve III kolajenden oluşan tabaka (lamina propria) ve keratinize olmayan mukozal epitelden oluşan iç tabakayla trilaminar bir yapıya sahiptir.[122]

Timpanik membran havada asılı olması nedeniyle benzersiz yara iyileştirici özelliklere sahiptir ve organizmanın diğer dokularının aksine onarımda görevli hücrelerin üzerinde göç edebileceği hazır bir yatak mevcut değildir. TM epitelinin mitojenik aktivitesi normal ortamda dermal epitele göre düşüktür.[123] Fakat altta yatan sebepleri değişiklik gösteren bir hasar sonrası, progenitör veya kök hücreler içerdiği gösterilen malleus sapı ve timpanik annulus bölgeleri TM'de mitojenik aktivitenin artış gösterdiği alanlardır ve dolayısıyla bu bölgelerin komşuluğundaki pars tensa kısımları proliferatif bölgeler olarak adlandırılır.[37,123] Bu kümelenme karşısında pars flaccidadaki mitojenik aktivite dağınık şekilde bulunur.

Temelde perforasyonun kapanması epitel migrasyonu ile olmakla beraber spontan iyileşen neomembranda fibröz orta tabaka yoktur bu özellik yeni oluşan zarı akustik travmalara daha dirençsiz ve retraksiyon ceplerinin oluşmasına daha duyarlı hale getirir.[124] Bu sebeple klinikte TM'nin trilaminer yapısının oluşumunu destekleyen rekonstrüktif seçeneklere ihtiyaç duyulmaktadır.

Timpanik membran epitelinin onarım aşamalarıyla ilgili verilerin çoğunun kaynağını, dermal yaralarının iyileşmesiyle ilgili araştırmalar oluşturur.[125] Yapılan çalışmaların çoğunda oluşan ortak görüş, TM perforasyonu kapanma mekanizması büyüyen bağ dokusu önünde ilerleyen hiperplastik keratinize skumaöz epitelin proliferasyonuyla perforasyon alanında bir destek oluştuğunu ve mukozal hücreler tarafından açık alanın kapatıldığı şeklindedir.[27] (Şekil 3).



Şekil 3: *Timpanik membranda perforasyon sonrası meydana gelen olaylar: Yaralanma sonrası TM katmanlarının görünümü (A); Perforasyon kenarlarında eksüda ve inflamatuar hücrelerin birikimi (B); Keratin-hyalüran katmanının göç edecek epitel hücreleri için iskele görevi görmesi (C); Dış epitel ilk kapanan katmandır ve onu mukozal katmanın takip etmesi (D); Fibröz tabakanın hyalüranik asit ile organize oluşu (E). (Teh BM, Shen Y, Friedland PL, Atlas MD, Marano RJ. A review on the use of hyaluronic acid in tympanic membrane wound healing. Expert Opin Biol Ther. 2012;12(1):23-36.)*

Sıçanların TM'leri farklılıklar içerse de, histomorfik olarak insan TM'si ile en yakın benzerlikte olması, sıçan TM modellerinin non-invaziv araştırmalarda kullanılabilmesini mümkün kılmıştır. TM pars tensası insanlarınkine benzer keratin ve kollajen lifler içermektedir.[126] Ratlarda TM, insan TM'sine daha az katman içermekle birlikte çok daha ince ve travmaya açıktır. Rat TM kalınlığı 4 ile 6 μm arasında değişkenlik gösterirken; insanlarınki 30 ile 95 μm arasında olup sıçanlarınkinden çok daha kalındır. Keratinosit tabakası, insanlarda üç ile beş hücre katmanından oluşurken, sıçanlarda bir ile iki hücre sırasında düzenlenmiştir.[127]

Perforasyon sonrası TM tipik olarak inflamatuar, proliferatif ve yeniden şekillenme fazlarını içeren ve birbiriyle örtüşen bir dizi olayla iyileşmesi sebebiyle cilt hasarı onarımı mekanizmalarıyla benzerlik gösterir. TM'nın farklı histomorfolojik özellikleri sebebiyle, başlangıçta membranın dış tabakasının skuamöz epiteli perforasyon üzerinde bir köprü oluşturarak perforasyon kapanmasından sorumludur. Fakat ilerleyen aşamalarda orta tabakanın fibröz dokusu ve membranın mukozal tabakasında gerçekleşen restorasyon kapanmadan sorumlu olacaktır.[128]

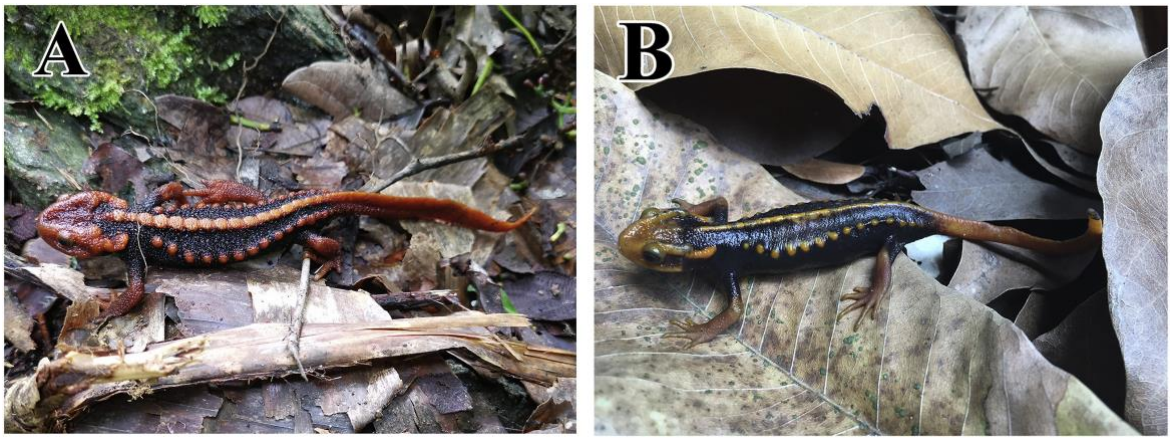
İlk aşama olan inflamatuar fazda, cilt yaralarında olduğu gibi perforasyon bölgesinde de ilk olarak hemostaz ve plak agregasyonu gerçekleşir bunu lokal inflamatuar yanıt takip eder. Bu yanıt sırasında vasküler geçirgenlik artışıyla sitokinlerin salınımı sonrası nötrofiller, lökositler, fibroblastlar ve diğer hücresel elemanlar yara bölgesine göç eder. Böylece mitotik aktivite başlar ve fazla miktarda keratin birikimiyle perforasyon kenarı hiperplastik hale getirir.[33]

Skuamöz epitelin proliferasyonu ve migrasyonu, granülasyonun oluşması ile devam eden ikinci iyileşme aşaması proliferasyon fazıdır. Daha öncede belirttiğimiz gibi TM ana proliferasyon alanları timpanik anulus ve malleus sapı yakınıdaki pars tensa alanları olduğu genel görüştür. Kaftan ve ark.[36] rat TM modelinde yaptıkları çalışmada malleus sapının kısmi olarak çıkarıldığı deney grubunda perforasyonun iyileşmediğini göstermiş olmaları bu görüşü desteklemektedir. İyileşmenin bu fazı belirgin fibroblastik aktivite ve vasküler proliferasyonu içerir.[129] TM perforasyon kenarının proliferatif bazal hücre tabakasından yoksun olması reepitelizasyonun kökenin farklı olduğu yönünde kanıt oluşturur.[123] Buna

örnek olarak, Reeve[130] bazal hücre tabakasının proliferatif yanıtın maksimum olduğu bölgeyi perforasyon kenarından 2 mm uzaklıkta olduğunu tanımlamış olup bir başka çalışmada ise Mc Minn ve ark.[14] otuz hücre uzaklıkta olduğunu bildirmişlerdir. Her hasar süreci doku hacminde ve kütlesinde kayba sebep olur ve iyileşme esnasında bu yara yatağının doldurulması ihtiyacını ortaya çıkarır.[131] Buradan yola çıkıldığında granülasyon dokusu oluşumu deride yaranın dibinden başlarken, TM'nin timpanik kavite ile dış kulak yolu arasında havada asılı durması sebebiyle perforasyonun kenarlarından başlar.[37]

Fibroblastlardaki artış, artan kolajen sentezinden kaynaklanan köprüler yoluyla epitelizasyonu hızlandırır ve perforasyonun kapanmasına neden olur.[126] Perforasyonun kapanmasıyla birlikte yeniden şekillenme fazı başlar ve lökositlerden salınan matriks metalloproteinazlar yeniden epitelizasyon ve yeniden şekillenmeye katkıda bulunur.[126] Çoğu yara iyileşme modelinde, fibroblastlar çoğunlukla epitel hücrelerinin üzerinde göç edeceği kolajenden oluşan bağ dokusu iskelesi üretir.[132] TM iyileşme modellerinde küçük bir değişiklik vardır. Yaranın bağ dokusu ile birincil olarak kapanması yerine, epitel tabakası ikincil fibröz tabaka rejenerasyonu için bir çerçeve sağlamak üzere yaranın üzerine göç eder.[133]

7.5 TYLOTOİN PEPTİT



Şekil 4: *Erkek Tylototriton verrucosus: A, Doi Pha Hom Pok Ulusal Parkı, Chiang Mai Eyaleti; B, Doi Chang, Chiang Rai Province. [Pomchote, Porrawee & Peerachidacho, Parada & Hernandez, Axel & Onishi, Yasuho & Nishikawa, Kanto. (2021). Description of the Himalayan newt Tylototriton verrucosus (Urodela: Salamandridae) in northern Thailand with its phylogenetic relationships, distribution, and conservation status. Journal of Asia-Pacific Biodiversity. 10.1016/j.japb.2021.10.006.]*

Tylotoin peptidi, Güneydoğu Asya'da bulunan bir semender türü olan Tylototriton verrucosus'un derisinden elde edilmiştir.[39] Tylototriton verrucosus, amfibilerin alt türüdür. Amfibiler hayatta kalmak için derilerinde mükemmel yara iyileştirme yeteneğine sahip peptidler içerir.[134–136]

Tylotoin, katelisidin antimikrobiyal peptit ailesinin bir üyesidir.[43] Katelisidinler omurgalılar arasında korunmuş bir peptit dizisidir. Endojen enzimatik işlemden sonra, çoğu doğrudan antimikrobiyal aktiviteye sahip biyoaktif peptitler salgılar.[137–140] Bu biyoaktif peptitler katelisidinlerin C terminalinde yerleşmiş olup; tylotoin de katelisidinin C terminalinde yer alır. Tylotoin, kimyasal yapısı molekül içi disülfit köprüsü oluşturabilen, teorik ağırlığı 1473.80 atomik kütle birimlik, 2 sistein de dahil olmak üzere 12 aa kalıntısından oluşan bir sentetik birleşiktir.[39] Kodlandığı aa sekansı, tam nükleotid dizisi(GenBank erişim no: KF031133) 146 aa'lık polipeptid alanı içerisinde yer alır.[39] Saflaştırılmış tylotoinin tam aminoasit dizisi Edman degradasyonu ile KCVRQNNKRVCK olarak belirlenmiştir.[39]

Tylotoinin topikal uygulamasının ciltteki yara iyileşmesinde destekleyici aktiviteye sahip bir sentetik peptit olduğu ilk kez 2014'te Mu ve ark.[39] tarafından deneysel bir hayvan modeli çalışmasında gösterilmiştir. Bu etki genel anlamda hücre sinyal yolakları ve biyoaktif/efektör maddelere dolaylı ve doğrudan etkileri ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bunlar; sitokin salınımını artırması (TGF-β1 ve IL-6), TGF-β sinyal yolağının kilit proteinleri olan smad2/smad3 aktivasyonu, MAPK sinyal yolağı üzerine olan düzenleyici etkileri olarak söylenebilir. Tylotoinin keratinositlerin, vasküler endotelyal hücrelerin ve fibroblastların motilitesini ve proliferasyonunu doğrudan artırarak yara bölgesinde reepitelizasyon ve granülasyon dokusu oluşumunu desteklediğini ve anjiyogenezi teşvik ettiğini göstermişlerdir.[39]

8. GEREÇ VE YÖNTEM

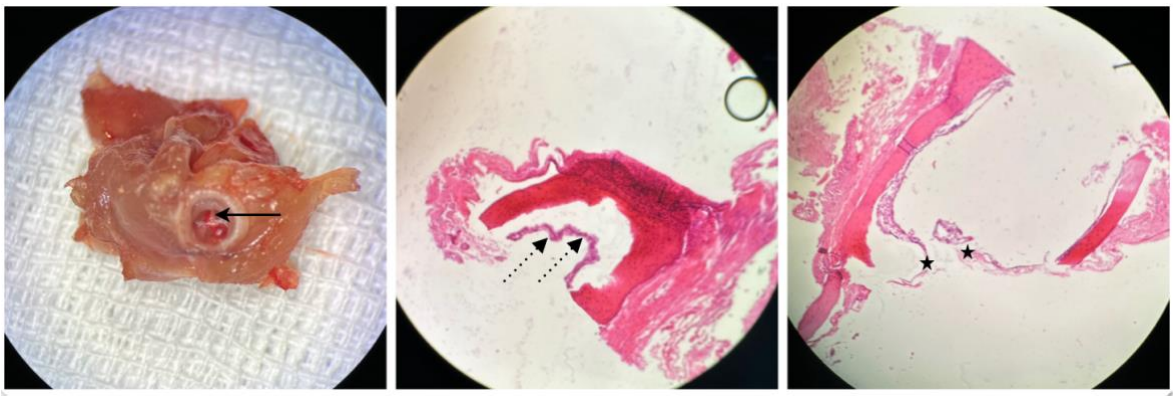
Bu deneysel hayvan çalışması Aralık 2023-Ocak 2024 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nde (DETAB) yürütülmüştür. Araştırma protokolü T.C.Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (KOÜ HAYDEK 7/2-2023). Çalışma Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi desteği (BAP Proje No: 2024/3604) ile gerçekleştirildi. Deney süresince Helsinki Deklorasyonu'nda deney hayvanları hakkında belirtilen bütün kurallara uyuldu.

Çalışmada DETAB'dan temin edilen 21 adet Wistar Albino türü sağlıklı dişi sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar ortalama 300-350 gr ağırlığındaydı. Sıçanlar araştırma merkezinin hayvan departmanında her biri ayrı kafeste, sıcaklık ve nem kontrollü (22±1°C'de %50±10 nemde) ve 12 saatlik aydınlık/karanlık döngülü ortamda barındırılmıştır. Hayvanların yiyecek ve su ad libituma serbest erişimleri sağlanmıştır.

8.1. Ön Çalışma

Tüm sıçanlar üzerinde yapılacak olan TM perforasyonu, timpanik bulla çıkarılması ve histopatolojik inceleme işlemleri için ratlardan biri üzerinde DETAB'da bir ön çalışma yapıldı. Ön çalışma bu deneğin proje etik kurul başvurusunda belirtildiği gibi sadece tek kulağı üzerinde gerçekleştirildi. Denek inhalasyon anestezisi ile sedatize edilerek her iki kulağı ameliyat mikroskopu ile değerlendirildi. Hayvanın dış kulak yolunun işlem yapmaya elverişili ve intakt TM belirlendi. Uygun olan sağ TM'ye mikroskopik görüntüleme altında diot lazer ile TM arka kadranına 3 milimetre çapında bir perforasyon oluşturuldu.

Ardından denek yüksek doz intraperitoneal sodyum pentetat ile kurban edildi ve deneke dekapitasyon işlemi uygulandı. Timpanik bulla cerrahi diseksiyon ile eksize edildi. Elde edilen doku bloğu formalin ile tespit edildi. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda histopatolojik inceleme için 5 µm kalınlığında kesitler haline getirildi. Kesitler sadece hematoksilen-eozin (H&E) ile boyanarak değerlendirildi (Şekil 5). Histopatolojik incelemede TM ve perforasyon alanı gözlendi. Yapılan ön çalışma, deneyin pratikte uygulanabilir olduğunu gösterdi.

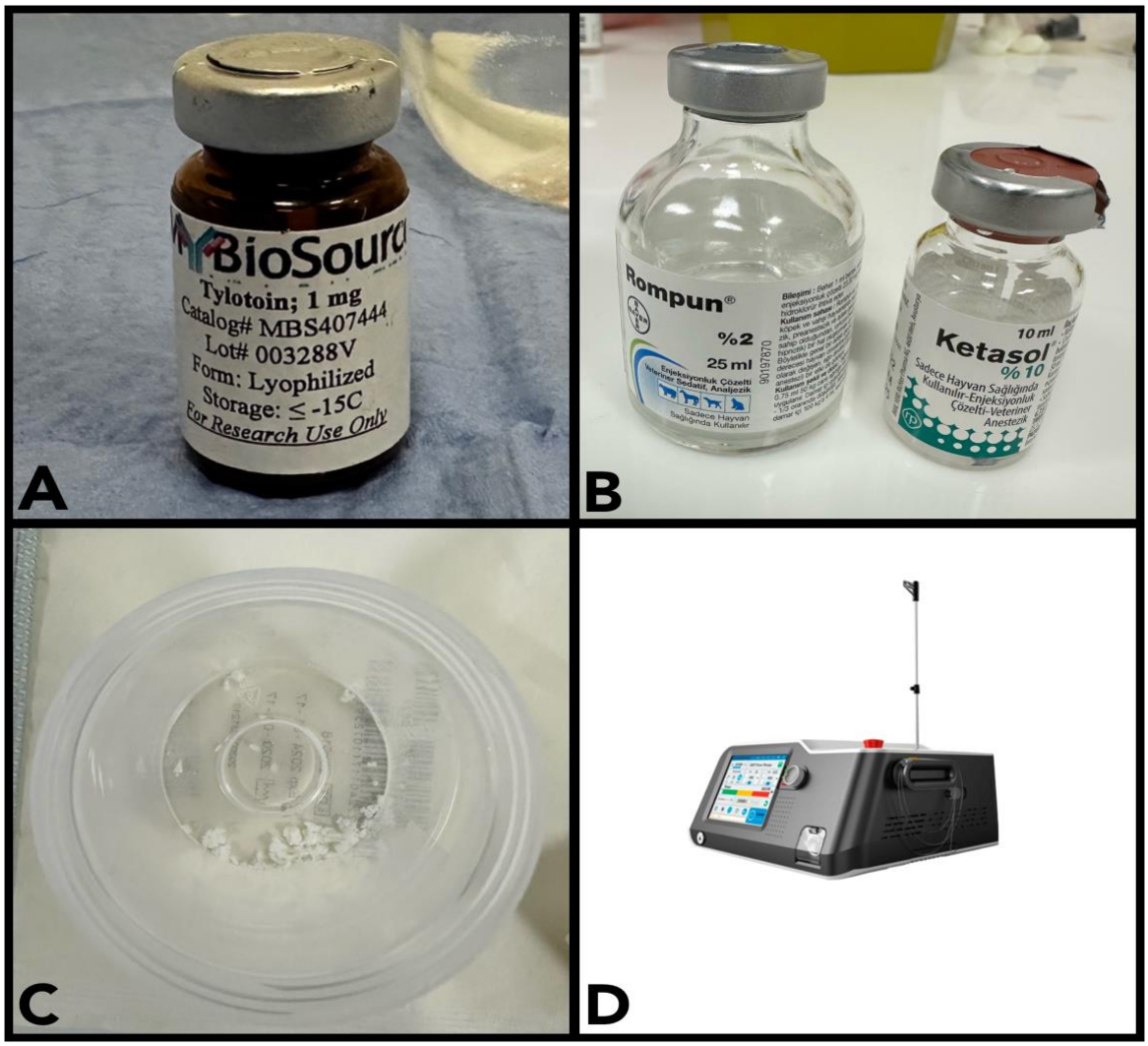


Şekil 5: *Ön çalışmadaki ratın timpanik bullasının cerrahi eksizyon sonrası görüntüsü (A) ve timpanik membrandaki perforasyon alanın hematoksilen-eozin (H&E) boyanmış kesitleri (B ve C). Malleus (siyah ok); intakt timpanik membran (kesikli ok); oluşturulan perforasyon kenarları (yıldız sembolü)*

8.2. Çalışma Günü (Birinci Gün)

8.2.1 Tylotoin Peptidinin Temini ve Hazırlanması

Kuru toz içeren 1 mg konsantrasyonluk flakon olarak soğuk zincirde muhafaza edilen tylotoin peptidi (Moleküler Formül: $C_{59}H_{108}N_{24}O_{16}S_2$; Moleküler Ağırlık: 1473,80 gr/mol; Ürün Katalog Kodu: MBS407444; MyBioSource, Inc.P.O. Box 153308 San Diego, CA 92195-3308 USA) etkin doz[39] (Ec50: 11.14 µg/ml) olacak konsantrasyonda distile su ile muamele edilip çözelti şeklinde topikal kullanıma hazır hale getirildi. Perforasyon kenarlarını kapatacak şekilde küçük parçalara ayrılan domuz jelatini emilebilir süngerler (Spongostan, Ferrosan Medical Devies, Soeborg, Danimarka) hazırlanan çözelti ile emdirildi (Şekil 6c).



Şekil 6: *Çalışmada kullanılan materyaller: Tylotoin peptidi (A); Anestezik ve Analjezik ilaçlar (B); Tylotoin peptidle muamele edilmiş domuz jelatini emilebilir süngerler (C); Timpanik membran perforasyonu oluşturmak için kullanılan diot lazer cihazı (D)*

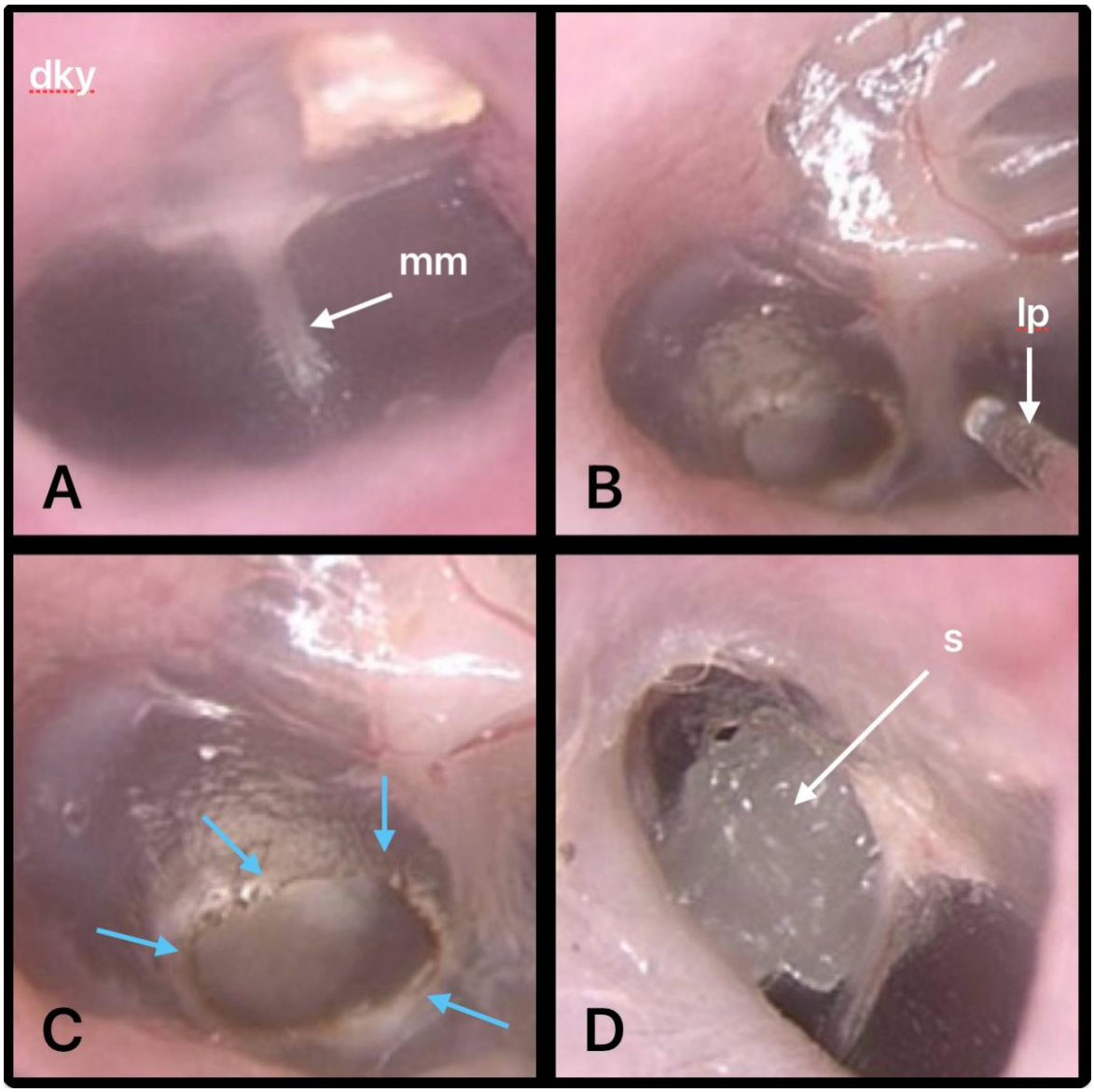
8.2.2. Ratların Anestezisi ve Çalışma Dizaynı

İlk olarak ratlar, anestezi amaçlı Ketamin 90mg/kg (Ketasol Richter pharma; Wels, Avusturya) ve analjezik olarak Xylazin HCl 10mg/kg (Rompun, Bayer; Leverkusen, Almanya) intraperitoneal yolla enjekte edilerek uyutuldu (Şekil 6b). Sonrasında, her bir sıçana Sefazolin 30mg/kg intramüsküler yolla ve Parasetamol 300mg/kg subkutan olarak verildi.

Ön çalışmada kullanılan 1 rattan sonra kalan 20 rat, sıralı olarak çekilen rastgele numaralara dayanarak, kontrol (n=10) ve deney grubu (n=10) olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Ratların her iki kulağı ameliyat mikroskopu (Leica 10x/23B geniş alan ayarlanabilir oküler) altında değerlendirildi. Ratların çalışmaya uygun, perforasyon, efüzyon, adezyon ve enfeksiyonu olmayan TM'si belirlendi ve çalışmada kullanıldı. Kontrol grubundaki deneklerin 5 sağ ve 5 sol TM'sine; deney grubundaki deneklerin 9 sağ ve 1 sol TM'si üzerinde işlem yapıldı.

Belirlenen TM'larda perforasyon oluşturmak için diot lazer (Kairos Medikal, Lotus Laser, Kartal, İstanbul) 12.0 watt, 120 Joule, 300 milisaniyede, 1470 nanometre dalga boyunda, tekli modda 200 μm fiber prob kullanıldı. (Şekil 6d). Lazer uygulaması mikroskopik görüntüleme altında ve TM arka kadranına 3 mm çapında bir perforasyon oluşturacak şekilde tek atış olarak gerçekleştirildi (Şekil 7b). HADYEK gereğince hayvan refahı etik ilkesine uyularak her ratın sadece tek bir kulağında perforasyon yapılmış olup diğer kulağına işlem yapılmamıştır.

Deney grubundaki ratların TM perforasyonu bölgesine tylotoin peptidi ile muamele edilmiş domuz jelatini emilebilir sünger perforasyonu tam kapatacak ve perforasyon kenarlarına temas edecek şekilde mikroskop altında yerleştirildi (Şekil 7d). Kontrol grubundaki ratların TM perforasyonlarına ise salin (%0,09 NaCl solüsyonu) emdirilmiş domuz jelatini emilebilir sünger aynı şekilde yerleştirildi.

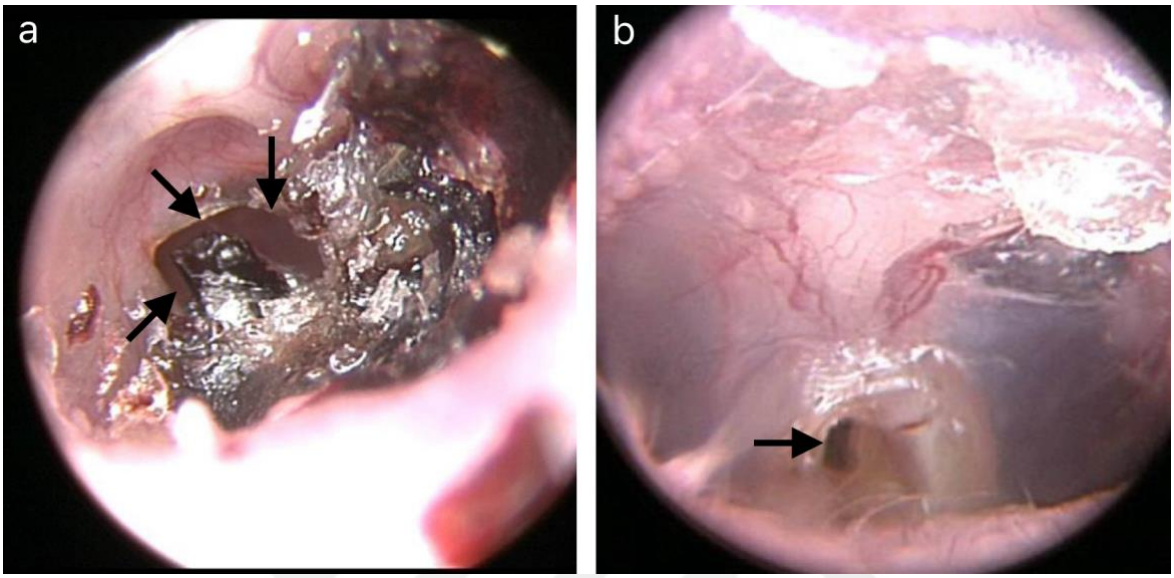


Şekil 7: *Rat kulaklarının endoskopik görüntüleri ve çalışmanın aşamaları: Normal timpanik membran görüntüsü (A); Diot lazer ile oluşturulan perforasyon (B); Perforasyon alanı ve lazer etkisi (C); Perforasyon alanını tam olarak kapatacak şekilde yerleştirilmiş tylotoin ile muamele edilmiş emilebilir sünger (D). Kısaltmalar: dış kulak yolu (dky); manibrium mallei (mm); lazer probu (lp); emilebilir domuz jelatini sünger (s)*

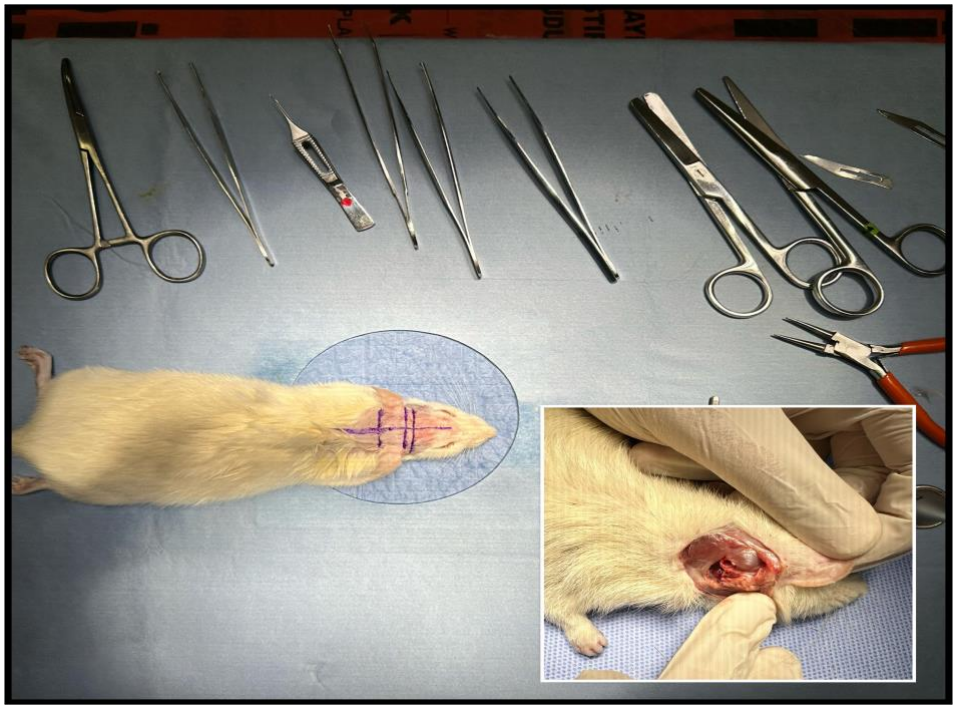
8.3. Çalışma Sonu (Otuzuncu gün)

Çalışma süresi boyunca tüm hayvanlar yaşamlarını sürdürdüler [kontrol grubu (n=10) ve deney grubu (n=10), toplam (n=20)]. Çalışmanın 30. Gününde, her iki gruptaki ratlar öldürücü dozda intraperitoneal pentotal (Pental sodyum, 80 mg/kg) uygulanarak kurban edildi. Çalışmaya dahil edilen kulaklar rijit teleskop ile endoskopik görüntüleme altında

değerlendirildi. Kontrol grubunda 3 numaralı ratın (Şekil 8a), deney grubunda ise 10 numaralı ratın (Şekil 8b) TM perforasyonları parsiyel kapanmış olup, diğer tüm sıçanların TM perforasyonları tam kapanmış olarak izlendi.



Şekil 8: *Çalışma sonu parsiyel iyileşme gösteren timpanik membranların endoskopik görüntüleri: 3 numaralı kontrol grubu ratın kulağı (8a); 10 numaralı deney grubu ratın kulağı (8b). 30 günün sonunda perfore kalan TM bölgeleri (Siyah oklar).*

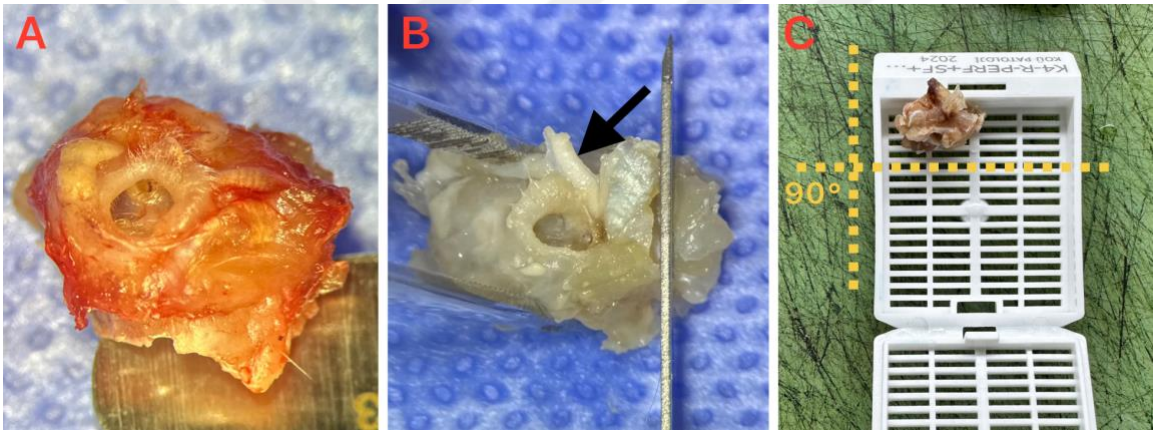


Şekil 9: *Timpanik bullanın çıkarılması işlemi*

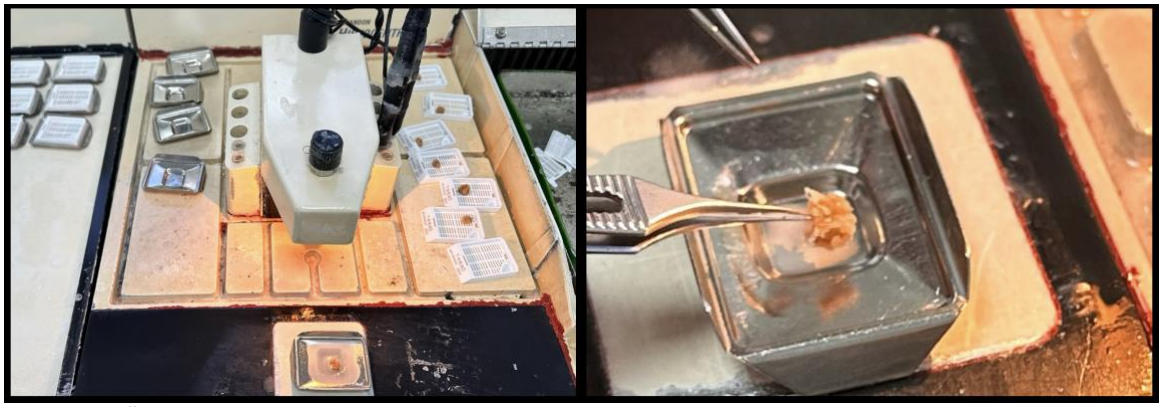
Daha sonra, DETAB ameliyathanesinde deneklerin başları gövdelerinden giyotin ile ayrıldı. Timpanik bullaları lateralde osteokartilajenöz bileşkeden ve medialde bikoronal orta kafatası hattından bistüri ile kesilerek çıkarıldı (Şekil 9). Alınan örnekler histopatolojik değerlendirme için oda sıcaklığında tamponlu %10 nötr formalinde (pH= 7,0) tespit edildi ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na yönlendirildi.

8.4. Histopatolojik İnceleme

Daha önceden formalin içinde transferi sağlanan örneklerin kemik materyalleri, De Castro solüsyonunda (kloral hidrat, nitrik asit, etanol, distile su) saklanarak dekalsifiye edildi. Timpanik bullalar mikroskop altında diseke edilerek (Şekil 10a) neomembran ve kemik annulusu içeren daha küçük doku blokları haline getirildi (Şekil 10b).



Şekil 10: *Timpanik bullanın kasete konumlandırılması: Deney sonu timpanik bullanın çıkarılmış hali (A); Dekalsifiye edilen timpanik bullanın kaset boyutlarına uygun küçültülmesi (B); Timpanik bulla içerisinde yer alan malleus boynu koronal eksende kaset tabanına 90° olacak şekilde yerleştirilmesi (C); Fasiyal sinir (siyah ok)*



Şekil 11: *Örneklerin parafin bloklara gömülmesi*

Örnekler otomatik bir doku takip cihazi (Thermo Scientific Spin Tissue Processor, STP-120, Almanya) kullanılarak takibe alındı. Neomembranı içeren doku bloğu, parafin kalıbının tabanı ile malleus boynu arasında koronal eksende 90° (Şekil 10c) açı ile konumlandırıldı ve parafine gömülerek bloklandı (Şekil 11). Daha sonra kesme doğrultusu aksiyal eksende malleus boynuna 90° olacak şekilde Slayt mikrotom (Thermo Fisher Scientific, HM 430, Almanya) ile 5 µm kalınlığında kesitler elde edildikten sonra kesitler hematoksilen-eozin (HE), Masson trikrom (MT), CD34 boyaları ile boyandı. MT ile olgun kemik kırmızı renkte ve kolajen lifleri, fibroblastik aktivite yeşil renkte gözlendi. Vasküler proliferasyon CD34 ile değerlendirildi. Patolog, ışık mikroskobu (BX61, Olympus, Japonya) ve dijital kamera (DP72, Olympus, Japonya) kullanarak her gruptan alınan kesitlerin kör olarak değerlendirdi. Morfometrik analiz için her neomembran örneğinden 12 slayt kullanıldı. Neomebranı içeren her alan ışık mikroskobunun x40 büyütmesinde fotoğraflandı. Ardından ektodermal tabakasının (epitel), mezodermal tabakanın (lamina propria) ve endodermal tabakasının (mukoza) kalınlıkları uPath programı (Ventana DP200) kullanılarak ölçüldü. Ölçümler malleus sapından 400 ila 600 µm arasındaki bir mesafede gerçekleştirildi. Kalınlıklar her bölgenin 3 farklı noktasından 150 µm aralıklarla alındı. Daha sonra bu 3 değerin ortalaması ortalama kalınlık değeri olarak kullanıldı. Fibröz tabaka, fibroblastik aktivite ve neovaskülarizasyona bakılarak yarı kantitatif olarak değerlendirildi. Fibroblastik aktivite “negatif” için 0, “hafif” için 1, “orta” için 2, ve “belirgin” için 3 olarak skorlandı. Örneğin; fibroblastik aktivitenin olmadığında 0, belirgin fibroblastik aktivite bulunduğunda 3 skoru verildi. Neovaskülarizasyon için 0-5 arası olan beşli skorlama sistemi kullanıldı. Örneğin; vasküler proliferatif aktivitenin olmadığında 0, belirgin vaskülarizasyon bulunduğunda 5 skoru verildi.

8.5. İstatiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme IBM SPSS 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) ile yapıldı. Normal dağılıma uygunluk Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Normal dağılım gösteren değişkenler ortalama±standart sapma, normal dağılım göstermeyen değişkenler medyan (25.-75. yüzdelik) olarak verildi. Kategorik değişkenler frekans (yüzde) olarak verildi. Gruplar arası karşılaştırmalar bağımsız örneklem t testi ve Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Sayısal değişkenler arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon analizi ile belirlendi. Hipotez testlerinde $p<0,05$ istatistiksel önemlilik için yeterli kabul edildi.

9.BULGULAR

Tylotoin uygulaması sonrası deney hayvanlarının normal hayata dönüşünde bir zorluk gözlenmedi. Yiyecek ve su tüketimde değişiklik gözlenmedi. Çalışma 20 rat (20 kulak) ile tamamlandı. Çalışma sonunda mukoza örnekleri alınmadan önce yapılan otomikroskobik muayenede iki hayvanın TM pars flascidasında retraksiyon ve bir hayvanın orta kulağında hematimpanum gözlendi. DKY'de akıntı, enfeksiyon, daralma ve orta kulakta enfeksiyon izlenmedi. Kontrol grubundaki hayvanların 9'unda TM perforasyonu kapanırken, 1 hayvanda kısmı kapanma oluşmuştur (%90 tam kapanma ve %10 kısmi kapanma). Deney grubunda da aynı şekilde 9'unda TM perforasyonu kapanırken, 1 hayvanda kısmı kapanma oluşmuştur (%90 tam kapanma ve %10 kısmi kapanma). Histopatolojik değerlendirmeler toplam 20 TM örneği üzerinden yapılmıştır.

Her iki grubun neomembran ortalama total kalınlığı, neomembranın üç katmanının (keratinize çok katlı yassı epitel, fibröz tabaka, mukoza) ayrı ayrı ortalama kalınlıkları; fibroblastik aktivite ve neovaskülarizasyon skorları Çizelge 1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1: *Neomembran ve katmanlarının ayrı ayrı ortalama kalınlıkları, fibroblastik aktivite ve neovaskülarizasyon medyan değerleri*

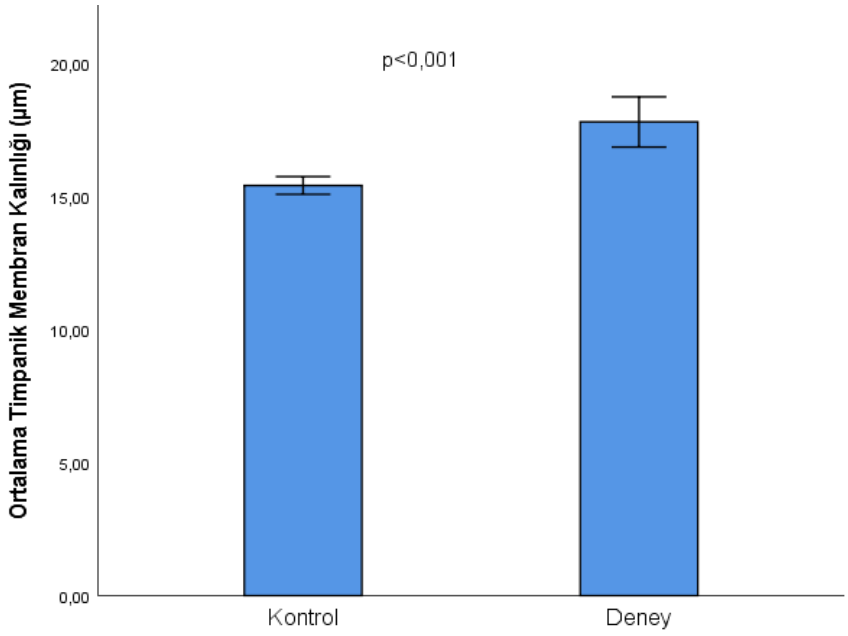
	Deney Grubu (n = 10)	**Kontrol Grubu** (n = 10)	*p*
Timpanik Membran Kalınlığı, Ort ± SS (µm)	17,82 ± 1,32	15,43 ± 0,47	<**0,001**[a]
Keratinize Skuamöz Epitel, Ort ± SS (µm)	8,27 ± 0,47	7,42 ± 0,23	<**0,001**[a]
Fibröz Tabaka, Ort ± SS (µm)	1,46 ± 0,18	0,28 ± 0,11	<**0,001**[a]
Mukozal Tabaka, Ort ± SS (µm)	8,21 ± 0,44	7,41 ± 0,17	<**0,001**[a]
Fibroblastik Aktivite, medyan (IQR)	2 (1–2)	1 (0–1)	**0,005**[b]
Neovaskülarizasyon, medyan (IQR)	3 (2–3,25)	1 (1–1,25)	<**0,001**[b]

Ort: Ortalama
SS: Standart sapma
IQR: Interquartile range (25.-75. yüzdelik)
[a]Bağımsız örneklem t testi
[b]Mann-Whitney U testi

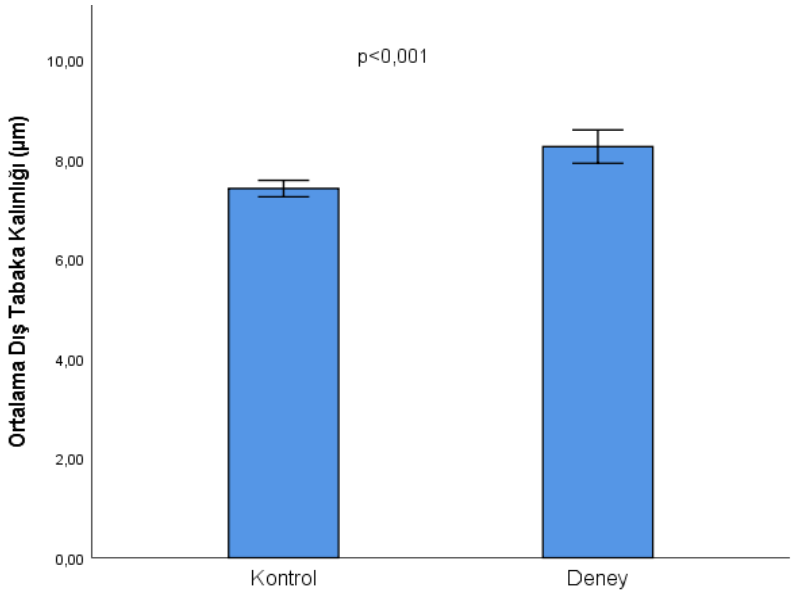
9.1. Neomembran ve Neomembran Tabakaların Ortalama Kalınlıkları

Histomorfolojik değerlendirmede deney grubundaki neomembran ortalama total kalınlığı (17,82±1,32 µm), kontrol grubundakilere (15,43±0,47 µm) göre anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.001$) (Çizelge 1). TM'nin üç katmanının (keratinize çok katlı yassı epitel,

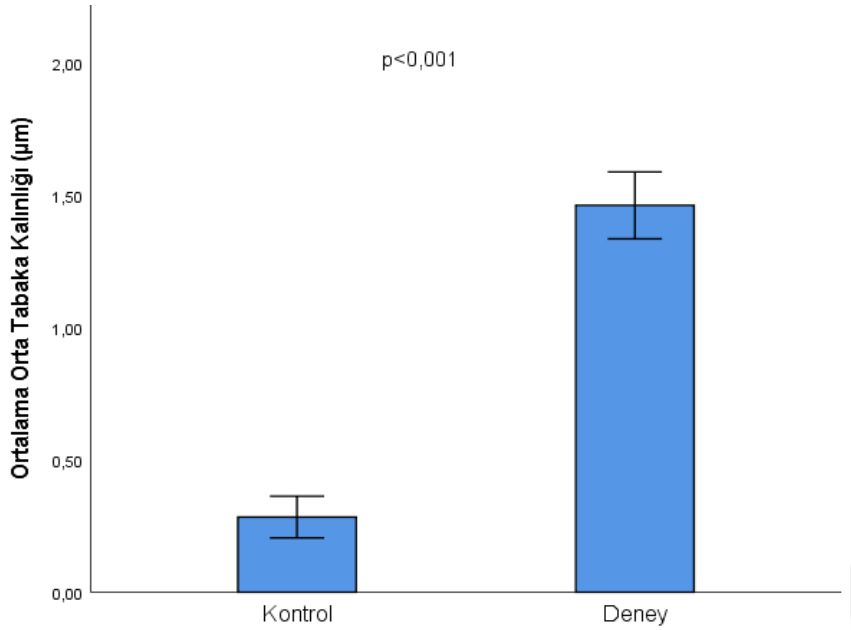
lamina propria, mukoza) ayrı ayrı ortalama kalınlıkları da yine deney grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha kalın olarak bulundu (her katman için p <0.001) (Çizge 2, 3, 4).



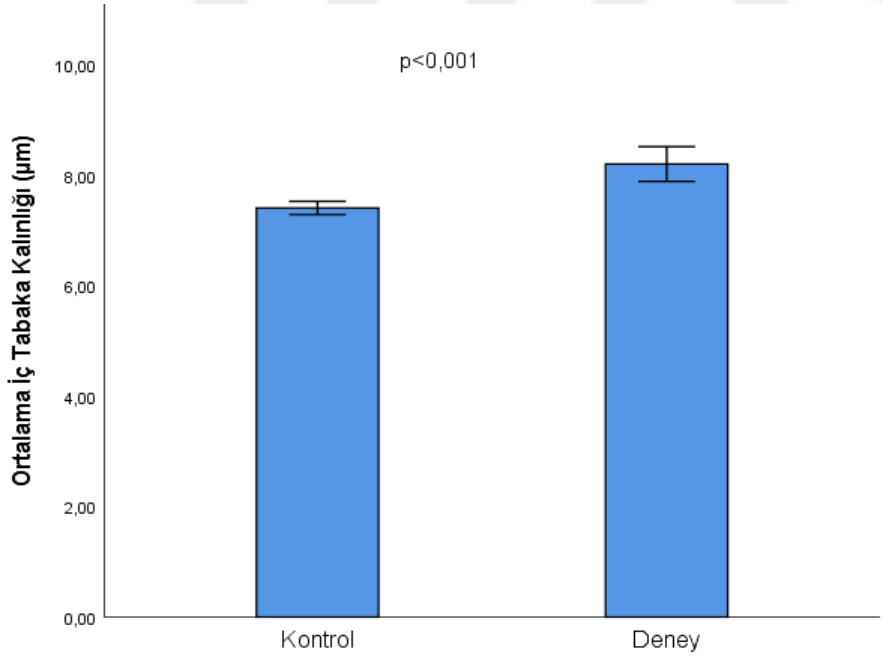
Çizge 1: *Kontrol ve deney grubunda neomembranın ortalama kalınlıkları*



Çizge 2: *Kontrol ve deney grubunda neomembranın dış (keratinize çok katlı yassı epitel) tabakasının ortalama kalınlıkları*

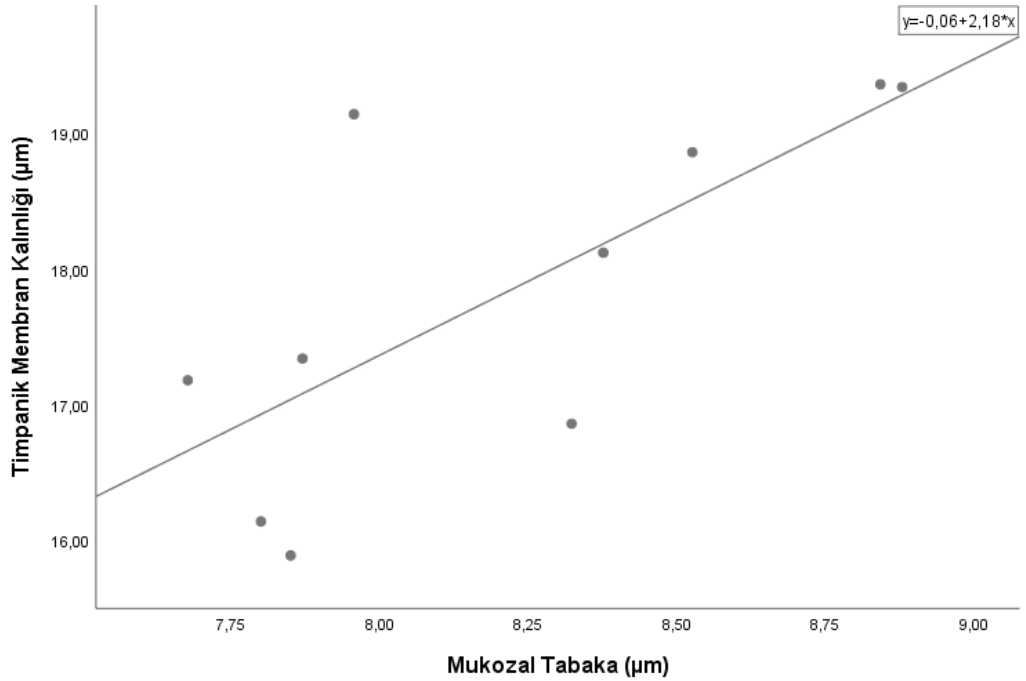


Çizge 3: *Kontrol ve deney grubunda neomembranın orta (lamina propria) tabakasının ortalama kalınlıkları*



Çizge 4: *Kontrol ve deney grubunda neomembranın iç (mukoza) tabakasının ortalama kalınlıkları*

Deney grubunda, total zar kalınlığı ile zarın her bir katmanın kalınlığı arasında yapılan korelasyon analizinde, total zar kalınlğı ile sadece mukoza (iç katman) kalınlığı arasında yüksek düzeyde korelasyon izlendi (r=0.782, p =0.008) (Çizge 5).

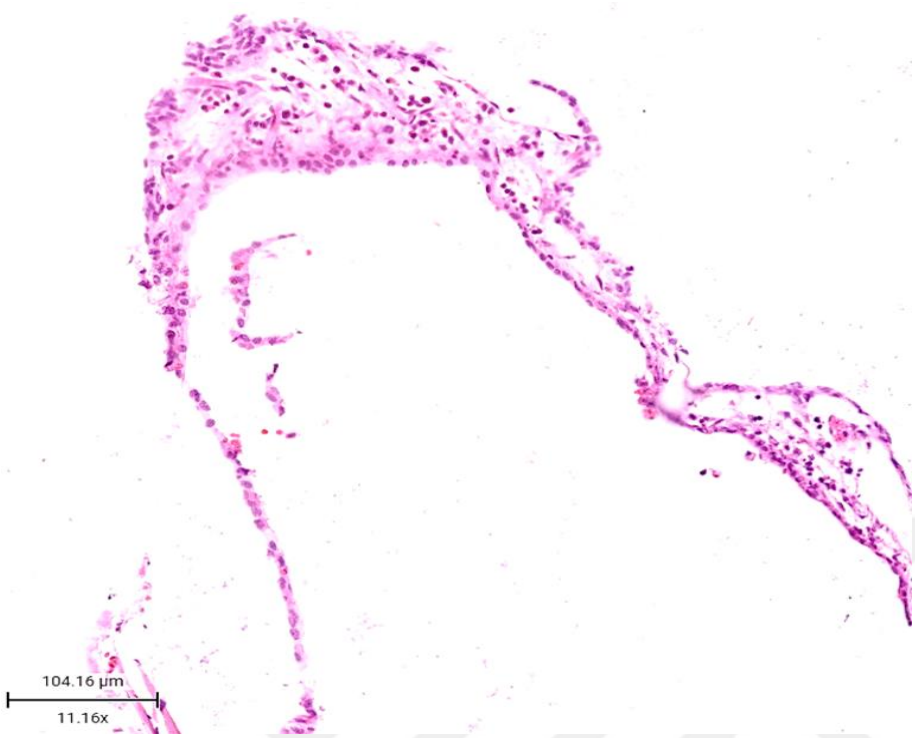


Çizge 5: *Deney grubundaki mukoza tabakasının kalınlıkları ile total neomembran kalınlıkları arasındaki saçılım grafiği*

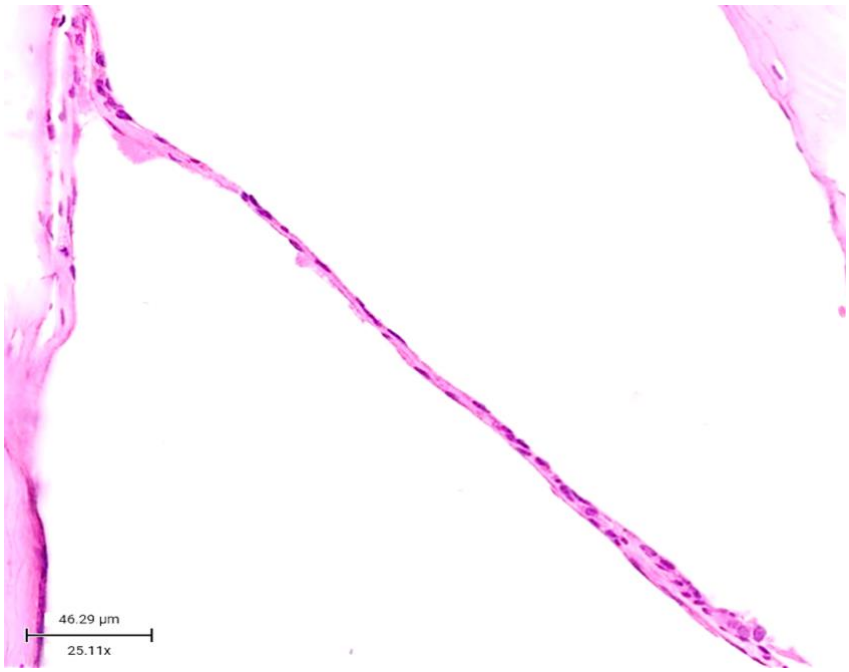
9.2. Fibroblastik Aktivite

Deney grubunda fibroblastik aktivite 3 (%30) kulakta '*grade 1*' ve 7 (%70) kulakta '*grade 2*' iken; kontrol grubunda 4 (%40) kulakta '*grade 0*', 5 (%50) kulakta '*grade 1*', ve 1 (%10) kulakta '*grade 2*' olarak bulundu. Her iki grubun fibroblastik aktivite düzeyleri karşılaştırıldığında deney grubunda fibroblastik aktivite median değeri 2 [IQR= 1.0–2.0], kontrol grubunda ise median değeri 1 [IQR= 0–1.0] olarak gözlendi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p =0.005).

Deney grubu neomembranlarında gözlenen fibroblastik aktivite düzeyleri ile TM total ortalama kalınlığı arasında veya neomembranın tüm tabakalarının kalınlıkları aralarında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon izlenmedi.



Şekil 12: *Deney grubuna ait timpanik zarın histopatolojik görünümü (H&E)*

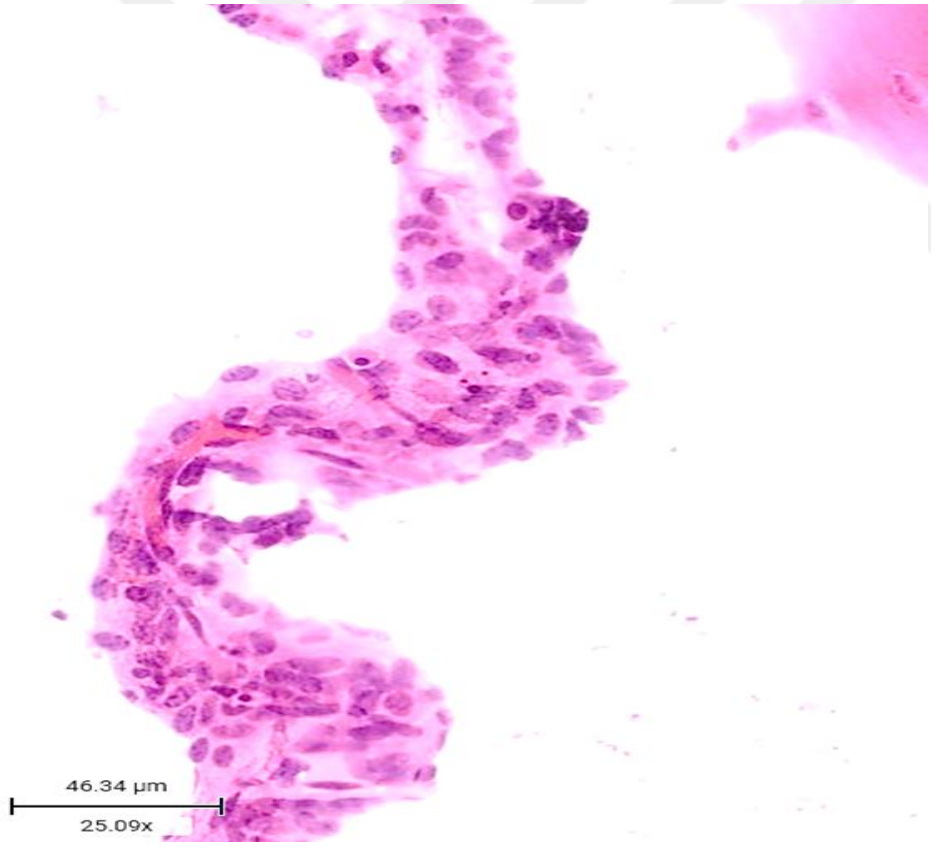


Şekil 13: *Kontrol grubuna ait timpanik zar histopatolojik görünüm (H&E)*

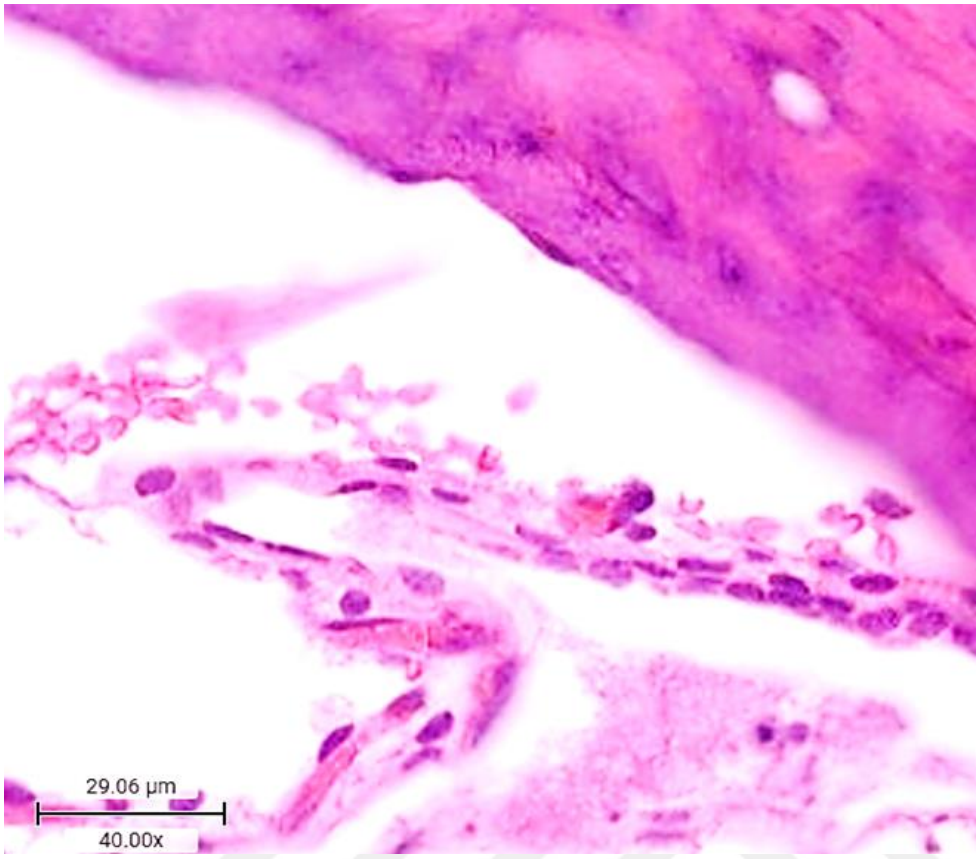
9.3 Neovaskülarizasyon

Deney grubunda neovaskülarizasyon derecesi 4 (%40) kulakta '*grade 2*', 4 (%40) kulakta '*grade 3*', ve 2 (%20) kulakta '*grade 4*' idi. (Şekil 14). Bu değerler kontrol grubunda 8 (%80) kulakta '*grade 1*' ve 2 (%20) kulakta '*grade 2*' olarak bulundu. (Şekil 15). Her iki grubun neovaskülarizasyon düzeyleri karşılaştırıldığında, deney grubunda neovaskülarizasyon median değeri 3 [IQR= 2.0–3.3], kontrollerde ise median değer 1 [IQR= 1.0–1.3] olarak gözlendi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p <0.001).

Deney grubu neomembranlarında gözlenen neovaskülarizasyon ile TM total ortalama kalınlığı arasında veya neomembranın tüm tabakalarının kalınlıkları aralarında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon izlenmedi.



Şekil 14: *Deney grubuna ait timpanik zardaki kapillarize damar artışı ve kollajenizasyon (H&E)*



Şekil 15: *Kontrol grubuna ait timpanik zarda orta derecede kapillarize damar artışı, kollajenizasyon (H&E)*

10.TARTIŞMA

Akut TM perforasyonlarında %80-90 oranında spontan iyileşme gözlenmektedir.[5,8,17] Kronik TM perforasyolarında ise gelişen cerrahi teknikler ile tedavinin başarı oranının %85-95 arasında olduğu bildirilmektedir.[7] Kronik perforasyonların cerrahi ile iyileşmemesi hem hasta açısından ek morbiditelere hem de ülke ekonomisi açısından ek mali yüke yol açmaktadır. Bu sorunları aşabilmek için günümüzde TM perforasyonun iyileşme oranını etkili ve güvenli bir şekilde arttırabilmek için birçok materyalin araştırılmasına devam edilmektedir. Birçok araştırmacı hayvan modelleri kullanarak, farklı düzenleyici maddelerin TM'deki yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Bunlar arasında hyaluran[6,18,20,21], EGF[85,87,89] ve PRP[9,31,141] en çok kabul gören maddelerdir. Fakat bu maddelerin TM iyileşme sürecindeki etki düzeyleri çalışmalar arasında farklılıklar göstermektedir.[1,4,18,22,23,25,29,30,34–37,142]

TM perforasyonunu iyileşme sürecini ve yeni oluşan membranın kalitesini arttırabilecek düzenleyici maddeler çoğunlukla ciltteki yara iyileşmesini arttırdığı gösterilen ajanlardan oluşmaktadır. Bir semender türü olan Tylototriton verrucosus Güneydoğu Asya'da yaşayan bir canlıdır. Semenderler, uzuvları da dahil olmak üzere vücudunun kaybolan veya hasar gören kısımlarını mükemmel şekilde yenileyebilen tek yetişkin omurgalıdır. Hayatta kalmak için derilerinde mükemmel yara iyileştirme yeteneğine sahip peptidler bulundururlar.[134–136] Tylotoin de bu peptidlerden biridir. Tylotoinin ciltteki yara iyileşmesini arttırıcı etkisi ilk olarak 2014'te Mu ve ark.[39] tarafından fare cildinde oluşturdukları deneysel bir hayvan modeli üzerinde yapılan çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada, topikal tylotoin uygulamasının fare cildindeki yara dokusunda keratinositleri, endotelyal hücreleri, fibroblastların sayısı ve göçünü arttırdığını göstermişlerdir. Böylece, tylotoinin yara bölgesinde reepitelizasyonu arttırdığını ve kolajenogenezin uyarılması ile granülasyon dokusu oluşumunu desteklediğini ve anjiyogenezi teşvik ettiğini göstermişlerdir. Bu etkilerini esas olarak sitokin salınımının artması (TGF-β1 ve IL-6), TGF-β sinyal yolağının kilit proteinleri olan smad2/smad3 aktivasyonu, MAPK sinyal yolağı üzerine olan düzenleyici aktiviteleri üzerinden gerçekleştirdiğini göstermişlerdir.[39]

Biz de bu sonuçlardan yola çıkarak ve TM iyileşmesi ile ciltteki yara iyileşmesinin mekanizmasının benzerlik göstermesinden dolayı, tylotoinin TM perforasyonu iyileşmesinde olumlu etkileri olabileceğini düşündük ve deneysel bir hayvan modeli ile

tylotoinin rat TM perforasyonu iyileşmesi üzerine etkisini araştırdık. Bildiğimiz kadarıyla, bugüne kadar topikal tylotoinin TM perforasyonu iyileşmesi üzerine olan etkisini inceleyen bir çalışma yapılmamıştır.

Çalışmamızın sonucunda, rat TM perforasyonlarında tek doz topikal tylotoin uygulamasının daha kalın bir neomembran ürettiğini gözlemledik. İstatistiksel analizlerde, tylotoinin neomembran kalınlığını, fibroblastik aktiviteyi ve neovaskülarizasyonu anlamlı şekilde arttırdığını gözlemledik. Total neomembran kalınlığının yanısıra membranın dış, orta ve iç katmanlarının kalınlıklarının da anlamlı olarak arttırdığını gördük. Deney grubundaki neomembran kalınlığındaki artış, mukozal katmandaki artış ile anlamlı derecede ilişki gösterdi. Otuzuncu günde zar perforasyon kapanma oranlarında deney ve kontrol grubu arasında farklılık gözlenmedi.

Rat kulaklarında oluşturduğumuz perforasyon modelinde topikal tylotoinin neomembran total kalınlığı anlamlı düzeyde arttırdığı gördük. Mu ve ark.[39] da farelerin sırtlarında oluşturdukları cilt yarası modelinde tylotoin uygulanan farelerin cildindeki epidermal ve dermal kalınlık ile granülasyon dokusu kalınlığının anlamlı olarak arttığını göstermişlerdir.

Neomebranın üç tabakasının ayrı ayrı kalınlıklarına baktığımızda, tylotoin uygulanan perforasyonlardaki neomembran her bir katmanının kontrollere göre anlamlı derecede kalın olduğu gözlenmiştir. Bu katmanlar içerisinde, kontrol grubuna kıyasla deney grubundaki lamina propriadaki daha fazla artış göze çarpmaktadır. TM'nin lamina propriasının ana bileşeni, önemli bir hücre dışı matriks ögesi olan, yüksek gerilme mukavemeti ve esneklik gösteren kollajendir.[143] Kollajen bu özelliğinden dolayı TM'nin esnekliğini ve bütünlüğünü korumaya yardımcı olur.[144] Çalışmamızdaki, ana bileşeni kollajen olan lamina propria tabakasındaki artışın, kaliteli ve bütünlüğü korunan bir neomembran oluşmasının sağlayabileceği, bunun da retraksiyon ceplerinin oluşmasını engelleyebileceği düşüncesindeyiz. Ayrıca, kollajen aynı zamanda ses iletiminde de önemli bir rol oynadığından[145], neomembranın titreşim ve ses iletimi gibi mekanik özelliklerini destekleyeceği kanısındayız. Ek olarak, travmalara da daha dayanıklı olacağı görüşündeyiz. Çünkü, kendiliğinden iyileşen neomembranlar fibröz tabakadan yoksundur ve bu tabakanın

göç etmemesi daha fazla hasara eğilimli gevşek bir membranla sonuçlanır[146] ve perforasyonlara karşı daha hassas kılar.[27,147] Mu ve ark.[39] fare cildindeki çizik deneyinde tylotoinin keratinositlerin göçünü ve çoğalmasını teşvik ettiğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda topikal tylotoin uygulamasının daha kalın bir keratinize çok katlı yassı epitel tabakası oluşturması keratinositlerin göçünü ve çoğalmasını indüklediğini göstermektedir. Mu ve ark.[39] ciltteki keratinositler bağ dokusu oluşumundan sonra iyileşme fazlarını ilerletirtiğini göstermiştir. TM iyileşmesinde sürecinde ise fibröz tabakanın rejenerasyonu için bir çerçeve oluşturular. Yani neomembrandaki fibröz tabaka oluşumunun başlaması için keratinositlerin perforasyon alanına gelmesi ve çoğalması oldukça önemlidir. Ayrıca, perforasyonın dış tabaka ile kapanması sonrasında mukozanın yürümesi de orta tabakanın restorasyonu desteklemektedir. Bulduğumuz tüm bu bulgular tylotoinin özellikle fibröz tabakada olmakla birlikte tüm katmanların onarımındaki olumlu etkisi ile neomembranın kalitesini arttırdığını göstermektedir.

Çalışmamızda bulduğumuz bir diğer sonuç ise tylotoinle tedavi edilmiş neomembrandaki fibroblastik aktivitede, kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış olmasıdır. Fibroblastlar yoğun hücresel aktivitenin meydana geldiği proliferasyon fazında primer hücrelerdir. Yara yerine göç eden fibroblastlar çevredeki sağlam venüllerden endotel hücrelerinin çoğalmasını indüklemesiyle anjiyogenez başlar süreci başlar ve granülasyon dokusunda yeni dolaşım ağı tesis edilir.[1,39,40] Yani fibroblastik aktivite yara iyileşmesinin özellikle proliferasyon aşaması olmak üzere her fazında oldukça önemlidir. Sonuçlarımız tylotoinin fibroblastik aktiviteyi arttırarak TM iyileşmesinde özellikle proliferasyon evresini desteklediğini göstermektedir.

Neovaskülerizasyon, yara bölgesinde fibroblastların yeni kollajen üretmesi ve hücre dışı matriksin güçlü bir bağ dokuya dönüşmesi için önemlidir.[71] Dolayısıyla kollajen ve güçlü bir hücre dışı matriks sağlam ve dayanıklı bir neomembran demektir. Mu ve ark.[39] da, deride tylotoinin endotelyal hücre tüp oluşumunu indüklediği, böylece tylotoinin yara bölgesine giden besin ve oksijeni arttırdığını göstermişlerdir. Çalışmamızda, tylotoin verilen gruptaki neovaskülarizasyonun, kontrol kulaklara nazaran anlamlı artış göstermesi perforasyon alanındaki neovaskülarizasyonu artırarak daha kaliteli bir neomembran oluşturduğu görüşündeyiz.

Tylotoinin yara iyileşmesi üzerindeki etki mekanizmaları Mu ve ark.[39] tarafından incelenmiştir. Yaptıkları araştırmada tylotoinin cilt yara bölgesinde makrofaj alımını hem indüklediği hem de makrofajları in vitro ve in vivo olarak TGF-β1 ve IL-6 salgılamaları için uyardığı gösterilmişlerdir.[39] Makrofajların TNF-α, IL-1β, IL-6 ve TGF-β1gibi yara iyileşmesiyle ilişkili birçok sitokin üretebildiği bilinmektedir.[148] TGF-β1 yara iyileşme süreçlerinde temel bir rol oynar. Hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücre dışı matriks oluşumunda önemli roller oynayan çok fonksiyonlu bir sitokindir.[149] TGF-β1'in yine inflamasyon, anjiyogenez, reepitelizasyon ve bağ dokusu rejenerasyonunda önemli olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir.[150] Bu bilgiler her ne kadar tylotoinin TM iyileşmesi üzerindeki etkilerini bu mekanizmalar üzerinden gerçekleştirmiş olabileceği düşüncesini oluşturmakla birlikte; çalışmamızda tylotoinin TM üzerindeki etkilerinin moleküler düzeydeki mekanizmasına bakılmamıştır.

Cilt yara iyileşmesi ile TM onarım aşamaları birbirine benzese de bazı farklılıklar içerir. İlk olarak, yapı itibariyle TM orta kulak boşluğu ile dış kulak yolu arasında havada asılı olarak konumlanmıştır. Bu nedenle TM iyileşmesinde granülasyon dokusu oluşumu yaranın tabanından değil, perforasyonun kenarlarından başlar. Kısa süreli bir hemostaz ve inflamatuar fazlardan sonra keratinize skuamöz epitelin malleus sapı ve annulus bölgelerinden perforasyona doğru proliferasyonu ve migrasyonu ile başlar. Malleus sapı ve annulus bölgeleri progenitör hücreler veya kök hücreler içerdiğinden proliferatif bölgeler olarak adlandırılmaktadır. Çoğalan ve yer değiştiren epitel, perforasyonun kenarlarında yığılmış bir kitle oluşturur ve yavaş yavaş onu kaplar. Perforasyon üzerinde göç eden epitel hücreleri kabuk ve keratin tabakası tarafından yönlendirilir.[37] Bu olay perforasyon alanında bir destek oluşturur ve mukozal hücreler tarafından açık alan kapatılır.[27] Spontan iyileşen neomembranda fibröz orta tabaka yoktur, bu özellik yeni oluşan zarı akustik travmalara daha dirençsiz ve retraksiyon ceplerinin oluşmasına daha duyarlı hale getirir.[54] Bu yüzdendir ki klinikte TM'nin trilaminer yapısının oluşumunu destekleyen greftlere ihtiyaç duyulmaktadır.[7,8]

Çalışmamızın bazı limitasyonları bulunmaktadır. İlk olarak, çalışmamızın örneklem büyüklüğü azdır. Fakat, etik kurulu protokolü gereği hayvan sayısı sınırlı tutulmuştur ve

hayvan refahı ilkesine uyulduğu için sıçanların sadece tek bir kulağına işlem yapılmıştır. Çalışmamız sıçanlar üzerinde gerçekleştirildiği için bulduğumuz sonuçlar tylotoinin insanlardaki perforasyon iyileşmesindeki etkisini yansıtmayabilir. Fakat, insan TM'leri ile sıçanların TM fizyolojileri benzerlikler içermektedir. Ayrıca, çalışmamızda immünositokimyasal inceleme ve taramalı elektron mikroskobisi yapılmadığı için tylotoinin TM'deki radyal ve dairesel kollajen fibril dizilimini nasıl etkilediği hakkında bir sonuç ortaya konulamadı. Ek olarak, araştırmamız otuzuncu günde sonlandırıldığından dolayı neomembrandaki kolesteatom ve sklerotik plak gelişimi, reperforasyon oluşumu gibi uzun dönem etkileri de incelenmedi. Her ne kadar çalışmamızın çeşitli limitasyonlartı bulunsa da, bu çalışma tylotoin peptidinin TM iyileşmesine olan etkisinin incelendiği ilk çalışmadır. Bulgularımızı destekleyecek daha ileri çalışmalarlara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca çalışmamızda TM perforasyonları diot lazer ile gerçekleştirildiği için perforasyonlar standart büyüklükte ve kenarları düzenli olacak şekilde oluşturulmuştur.

11.SONUÇ ve ÖNERİLER

Rat timpanik membran perforasyonuna tek doz tylotoin uygulanması daha sağlam ve kaliteli bir neomembran oluşturmaktadır. Tylotoin neomembranın her katmanın kalınlığını arttırarak daha kalın bir neomembran oluşturmaktadır. Tylotoin bu etkilerini perforasyon bölgesinde fibroblastik aktiviteyi ve neovaskülarizasyonu arttırarak gerçekleştiriyor gibi görünmektedir. Akut timpanik membran perforasyonlarında veya timpanoplasti cerrahilerinde emilebilir spongostan ile topikal tylotoin kullanımı, normal zarın yapısına benzer, dayanıklı, ve fizyolojik işitmeyi destekleyen bir neomembran oluşturarak cerrahi başarı şansını arttırabilir.

12.ÖZET

AMAÇ: Sıçan timpanik membran (TM) perforasyonlarında tek doz topikal tylotoin peptid uygulamasının histopatolojik etkilerini değerlendirmek.

GEREÇ ve YÖNTEMLER: Çalışma Kocaeli Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Birimin'de gerçekleştirildi. Yirmi dişi Wistar Albino sıçan, diyot lazer ışını kullanılarak 3 mm'lik bir perforasyona tabi tutuldu ve sıçanlar eşit olarak iki gruba ayrıldı. Deney grubuda, perforasyon üzerine tylotoin ile ıslatılmış domuz jelatin süngeri uygulanırken, kontrol grubunda, salin ile ıslatılmış sünger perforasyon üzerine uygulandı. Otuzuncu gününde, sıçanlar kurban edildi ve perforasyon kapanması mikroskopik olarak değerlendirildi. Alınan TM örnekleri boyandı ve neomembran kalınlığı histomorfometrik analiz yoluyla ölçüldü. Fibroblastik aktivite ve neovaskülarizasyon histolojik değerlendirme yoluyla yarı nicel olarak değerlendirildi.

BULGULAR: Her iki grupta da 9 TM'de tam TM kapanma gözlenirken, 1 TM'de kısmi kapanma oluştu. Deney grubunda (17.82±1.32 μm), kontrol grubuna (15.43±0.47 μm) göre anlamlı olarak daha kalın bir neomembran oluşumu gözlendi ($p < 0.001$). Her TM tabakasının ortalama kalınlığı da deney grubunda anlamlı derecede daha büyüktü ($p < 0.001$). Fibroblastik aktivite seviyeleri, deney grubunda kontrol grubuna göre daha yüksekti (medyan 2 [IQR= 1.0–2.0] ve medyan 1 [IQR= 0–1.0]) ($p = 0.005$). Neovaskülarizasyon, deney grubunda kontrol grubuna göre daha belirgindi (medyan 3 [IQR= 2.0–3.3] ve medyan 1 [IQR= 1.0–1.3]) ($p < 0.001$).

SONUÇ: Bu çalışmanın bulguları, sıçan timpanik membranı perforasyonlarında tek doz topikal tylotoin uygulamasının neomembranın ve tabakalarının kalınlığını arttırdığını ve dolayısıyla daha kaliteli bir zar oluşmunu sağlayacağını göstermektedir.

13.İNGİLİZCE ÖZET

AIM: To assess the histopathological effects of a single topical application of tylotoin peptide on rat tympanic membrane (TM) perforations.

MATERIALS AND METHODS: Twenty female Wistar Albino rats underwent a 3 mm perforation using a diode laser beam and were equally divided into two groups. The experimental group received a tylotoin-soaked porcine gelatin sponge on the perforation, while the control group received a saline-soaked sponge. On day 30, rats were sacrified and perforation closure was assessed microscopically. TM specimens were stained, and neomembrane thickness was measured via histomorphometric analysis. Fibroblastic activity and neovascularization were assessed semi-quantitatively through histological evaluation.

RESULTS: Complete TM closure was observed in 9 TMs of both groups, with partial closure in 1 TM. The experimental group exhibited a significantly thicker neomembrane (17.82±1.32 µm) compared to the control group (15.43±0.47 µm) ($p < 0.001$). Each TM layer thickness was also significantly greater in the experimental group ($p < 0.001$). Fibroblastic activity levels were higher in the experimental group (median 2 [IQR= 1.0–2.0]) than the control group (median 1 [IQR= 0–1.0]) ($p = 0.005$). Neovascularization was more pronounced in the experimental group (median 3 [IQR= 2.0–3.3]) compared the control group (median 1 [IQR= 1.0–1.3]) ($p < 0.001$).

CONCLUSION: The findings of this study demonstrate that a single topical application of tylotoin in rat tympanic membrane perforations increases the thickness of the neomembrane and its layers, thereby resulting in the formation of a higher quality neomembrane.

14.KAYNAKLAR

1. Araujo MM, Murashima AAB, Alves VM, Jamur MC, Hyppolito MA. The topical use of insulin accelerates the healing of traumatic tympanic membrane perforations. *The Laryngoscope*. 2016;126(1):156-162.

2. Parekh A, Mantle B, Banks J, et al. Repair of the tympanic membrane with urinary bladder matrix. *The Laryngoscope*. 2009;119(6):1206-1213.

3. Ozturk K, Yaman H, Cihat Avunduk M, Arbag H, Keles B, Uyar Y. Effectiveness of MeroGel hyaluronic acid on tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 2006;126(11):1158-1163.

4. Demirdelen S, İmamoğlu M, Arslan S, Sayğın İ. Topical dexpanthenol application improves healing of acute tympanic membrane perforations: an experimental study. *ENT Updat*. 2016;6(3):116-120.

5. Lindeman P, Edström S, Granström G, et al. Acute traumatic tympanic membrane perforations. Cover or observe? *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1987;113(12):1285-1287.

6. Teh BM, Shen Y, Friedland PL, Atlas MD, Marano RJ. A review on the use of hyaluronic acid in tympanic membrane wound healing. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12(1):23-36.

7. Illés K, Gergő D, Keresztély Z, et al. Factors influencing successful reconstruction of tympanic membrane perforations: a systematic review and meta-analysis. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg*. 2023;280(6):2639-2652.

8. Levin B, Rajkhowa R, Redmond SL, Atlas MD. Grafts in myringoplasty: utilizing a silk fibroin scaffold as a novel device. *Expert Rev Med Devices*. 2009;6(6):653-664.

9. Yeo SW, Kim SW, Suh BD, Cho SH. Effects of platelet-derived growth factor-AA on the healing process of tympanic membrane perforation. *Am J Otolaryngol*. 2000;21(3):153-160.

10. Sheehy JL, Anderson RG. Myringoplasty. A review of 472 cases. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1980;89(4 Pt 1):331-334.

11. Shen Y, Redmond SL, Teh BM, et al. Scaffolds for tympanic membrane regeneration in rats. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(5-6):657-668.

12. Merchant SN, McKenna MJ, Rosowski JJ. Current status and future challenges of tympanoplasty. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg*. 1998;255(5):221-228.

13. Hough JV. Tympanoplasty with the interior fascial graft technique and ossicular reconstruction. *The Laryngoscope*. 1970;80(9):1385-1413.

14. Taylor M, McMinn RM. Cytology of repair in experimental perforation of the tympanic membrane and its relationship to chronic perforations in man. *Trans - Am Acad Ophthalmol Otolaryngol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1967;71(5):802-812.

15. Ishimoto S ichi, Ishibashi T. Induction of growth factor expression is reduced during healing of tympanic membrane perforations in glucocorticoid-treated rats. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2002;111(10):947-953.

16. Lou Z, Li C, Yu D, Wang J, Chen Z, Yin S. Comparison of healing of acute total tympanic membrane perforation between rats with and without excision of the mallear handle. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*. 2023;8(6):1648-1656. doi:10.1002/lio2.1175

17. Aggarwal R, Saeed SR, Green KJM. Myringoplasty. *J Laryngol Otol*. 2006;120(6):429-432.

18. Güneri EA, Tekin S, Yilmaz O, et al. The effects of hyaluronic acid, epidermal growth factor, and mitomycin in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol Off Publ Am Otol Soc Am Neurotol Soc Eur Acad Otol Neurotol*. 2003;24(3):371-376.

19. Chauvin K, Bratton C, Parkins C. Healing large tympanic membrane perforations using hyaluronic acid, basic fibroblast growth factor, and epidermal growth factor. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg*. 1999;121(1):43-47.

20. Rivas Lacarte MP, Casasin T, Alonso A. Effects of sodium hyaluronate on tympanic membrane perforations. *J Int Med Res*. 1992;20(4):353-359.

21. Stenfors LE. Repair of tympanic membrane perforations using hyaluronic acid: an alternative to myringoplasty. *J Laryngol Otol*. 1989;103(1):39-40.

22. Bilge A, Gunes A, Dagli M, Koybasioglu FF, Guvey A. The impact of topical and systemic enoxaparin sodium use on traumatic tympanic membrane perforation and myringosclerosis. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg*. 2016;273(10):3035-3041.

23. Ayata M, Kaptan Z, Uzunkulaoğlu H, et al. Effect of Enoxaparin Sodium on Experimentally-Induced Myringosclerosis in Rats. *J Int Adv Otol*. 2015;11(3):192-195.

24. Hellström S, Spandow O. Exogenous heparin, topically administered, aids the remodelling of connective tissue in the healing of experimental tympanic membrane perforations. *ORL J Oto-Rhino-Laryngol Its Relat Spec*. 1994;56(1):45-50.

25. Seonwoo H, Kim SW, Shin B, et al. Latent stem cell-stimulating therapy for regeneration of chronic tympanic membrane perforations using IGFBP2-releasing chitosan patch scaffolds. *J Biomater Appl*. 2019;34(2):198-207.

26. O'Daniel TG, Petitjean M, Jones SC, et al. Epidermal growth factor binding and action on tympanic membranes. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1990;99(1):80-84.

27. Mondain M, Ryan A. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor are induced in guinea-pig tympanic membrane following traumatic perforation. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1995;115(1):50-54.

28. Andersen DO, Weber ND, Wood SG, Hughes BG, Murray BK, North JA. In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Antiviral Res*. 1991;16(2):185-196.

29. Santa Maria PL, Redmond SL, Atlas MD, Ghassemifar R. Keratinocyte growth factor 1, fibroblast growth factor 2 and 10 in the healing tympanic membrane following perforation in rats. *J Mol Histol*. 2011;42(1):47-58.

30. Clymer MA, Schwaber MK, Davidson JM. The Effects of Keratinocyte Growth Factor on Healing of Tympanic Membrane Perforations. *The Laryngoscope*. 1996;106(3):280-285.

31. Erkilet E, Koyuncu M, Atmaca S, Yarim M. Platelet-rich plasma improves healing of tympanic membrane perforations: experimental study. *J Laryngol Otol*. 2009;123(5):482-487.

32. Makuszewska M, Sokołowska M, Hassmann-Poznańska E, et al. Enhanced expression of hepatocyte growth factor in the healing of experimental acute tympanic membrane perforation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2015;79(7):987-992.

33. Ünsal N, Bayram A, Akay E, Yaşar M. The Effect of Allantoin on Chronic Perforation of Rat Tympanic Membrane. *J Int Adv Otol*. 2021;17(3):251-254.

34. Yaşar M, Kaya A, Karaman H, et al. Potential Curative Role of Hypericum Perforatum in an Experimental Rat Model of Tympanic Membrane Perforation. *J Int Adv Otol*. 2016;12(3):252-256.

35. Puolakkainen PA, Reed MJ, Gombotz WR, Twardzik DR, Abrass IB, Sage HE. Acceleration of wound healing in aged rats by topical application of transforming growth factor-beta(1). *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 1995;3(3):330-339.

36. Kaftan H, Herzog M, Miehe B, Hosemann W. Topical application of transforming growth factor-beta1 in acute traumatic tympanic membrane perforations: an experimental study in rats. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 2006;14(4):453-456.

37. Makuszewska M, Cieślińska M, Winnicka MM, Skotnicka B, Niemczyk K, Bonda T. Enhanced Expression of Plasminogen Activators and Inhibitor in the Healing of Tympanic Membrane Perforation in Rats. *J Assoc Res Otolaryngol JARO*. 2023;24(2):159-170.

38. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-746.

39. Mu L, Tang J, Liu H, et al. A potential wound-healing-promoting peptide from salamander skin. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2014;28(9):3919-3929.

40. Alves RS, Alves LB, Altoé LS, et al. Peptides from Animal Origin: A Systematic Review on Biological Sources and Effects on Skin Wounds. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:4352761.

41. Wang Y, Guo L, Liu J, et al. Chitosan/PLGA shell nanoparticles as Tylotoin delivery platform for advanced wound healing. *Int J Biol Macromol*. 2022;220:395-405.

42. Horn M, Neundorf I. Design of a novel cell-permeable chimeric peptide to promote wound healing. *Sci Rep*. 2018;8(1):16279.

43. Wang X, Duan H, Li M, Xu W, Wei L. Characterization and mechanism of action of amphibian-derived wound-healing-promoting peptides. *Front Cell Dev Biol*. 2023;11.

44. Fuchs JC, Tucker AS. Development and Integration of the Ear. *Curr Top Dev Biol*. 2015;115:213-232.

45. Dhingra P, Dhingra S, Dhingra D. *Diseases of Ear, Nose and Throat & Head Neck Surgery*. 6. Basım. İndia: Reed Elsevier; 2014.

46. Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Uzmanlık Eğitimi Kaynak Kitap-1. Editörler Kıroğlu M, Yiğit Ö, Keleş E, Kara CO, Aklan Z. Logos Yayıncılık, İstanbul. Ekim, 2018;ss 443-44.

47. Wu DK, Kelley MW. Molecular mechanisms of inner ear development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(8):a008409.

48. Ismaeil WM. EAR, NOSE, AND THROAT DISEASES, 3rd ednH Behrbohm, O Kaschke, T Nawka, A Swift Thieme, 2009 ISBN 978 3 13 671203 0 pp 471 *The Journal of Laryngology & Otology*. 2010;124(7):821-821.

49. Matsune S, Takahashi H, Sando I. Mucosa-associated lymphoid tissue in middle ear and Eustachian tube in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1996;34(3):229-236.

50. Gurov AV, Kryukov AI, Levina JV, Bakhtin AA, Dubovaya TK, Murzakhanova ZV. [Hearing dynamics in acute traumatic perforation of the tympanic membrane after application of blood plasma enriched with platelet growth factors]. *Vestn Otorinolaringol*. 2021;86(4):23-30.

51. Witt R. Cummings Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Jama-J Am Med Assoc - JAMA-J AM MED ASSN*. 2005;293:1672-1673.

52. Blasi F, Sidenius N. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett*. 2010;584(9):1923-1930.

53. Stenfors LE, Carlsöö B, Salén B, Winblad B. Repair of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1980;90(5-6):332-341.

54. Johnson AP, Smallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. A two-dimensional histological study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1990;109(5-6):406-415.

55. Otoloji Kbb Notları. Editör Bakır S. Derman Tıbbi Yayıncılık, Ankara, 2015;ss 50-52.

56. Mansour S, Magnan J, Haidar H, Nicolas K, Louryan S. *Comprehensive and Clinical Anatomy of the Middle Ear*.; 2013.

57. Erixon E, Högstorp H, Wadin K, Rask-Andersen H. Variational anatomy of the human cochlea: implications for cochlear implantation. *Otol Neurotol Off Publ Am Otol Soc Am Neurotol Soc Eur Acad Otol Neurotol*. 2009;30(1):14-22.

58. Judkins RF, Li H. Surgical anatomy of the rat middle ear. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg*. 1997;117(5):438-447.

59. Zimmer WM, Rosin DF, Saunders JC. Middle-ear development. VI: Structural maturation of the rat conducting apparatus. *Anat Rec*. 1994;239(4):475-484.

60. Liu J, Agrawal SK, Ladak HM, Wan W. Fiber Arrangement in the Rat Tympanic Membrane. *Anat Rec Hoboken NJ 2007*. 2016;299(11):1531-1539.

61. Hellström S, Salén B, Stenfors LE. Anatomy of the rat middle ear. A study under the dissection microscope. *Acta Anat (Basel)*. 1982;112(4):346-352.

62. Albuquerque AAS, Rossato M, Oliveira JAA de, Hyppolito MA. Understanding the anatomy of ears from guinea pigs and rats and its use in basic otologic research. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009;75(1):43-49.

63. Hitier M, Sato G, Zhang YF, et al. Anatomy and surgical approach of rat's vestibular sensors and nerves. *J Neurosci Methods*. 2016;270:1-8.

64. Bradshaw AP, Curthoys IS, Todd MJ, et al. A mathematical model of human semicircular canal geometry: a new basis for interpreting vestibular physiology. *J Assoc Res Otolaryngol JARO*. 2010;11(2):145-159.

65. Kondo T, Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Sci Int*. 2010;203(1-3):93-98.

66. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins SL. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Saunders; 1999.

67. Balsa IM, Culp WTN. Wound Care. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2015;45(5):1049-1065.

68. Balbino C, Pereira L, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Cienc Farm - RBCF*. 2005;41.

69. DiPietro LA, Burdick M, Low QE, Kunkel SL, Strieter RM. MIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. *J Clin Invest*. 1998;101(8):1693-1698.

70. Newman SL, Henson JE, Henson PM. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J Exp Med*. 1982;156(2):430-442.

71. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mechanisms involved in wound healing: a revision. *Rev Bras Ciênc Farm*. 2005;41:27-51.

72. Mei D, Guo X, Wang Y, et al. PEGylated Graphene Oxide Carried OH-CATH30 to Accelerate the Healing of Infected Skin Wounds. *Int J Nanomedicine*. 2021;16:4769-4780.

73. Doblaré M, García JM. Application of an anisotropic bone-remodelling model based on a damage-repair theory to the analysis of the proximal femur before and after total hip replacement. *J Biomech*. 2001;34(9):1157-1170.

74. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):509-528.

75. Montesano R, Orci L. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(13):4894-4897.

76. Madden JW, Peacock EE. Studies on the biology of collagen during wound healing. I. Rate of collagen synthesis and deposition in cutaneous wounds of the rat. *Surgery*. 1968;64(1):288-294.

77. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-746.

78. Guidugli Neto J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprouts and superficial loops of granulation tissue. I. Quantitative study of the vascular volume. *Rev Odontol Univ Sao Paulo*. 1987;1(4):6-8.

79. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 2008;16(5):585-601.

80. Galeano M, Deodato B, Altavilla D, et al. Adeno-associated viral vector-mediated human vascular endothelial growth factor gene transfer stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetologia*. 2003;46(4):546-555.

81. Cohen S, Elliott GA. The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *J Invest Dermatol*. 1963;40:1-5.

82. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 1990;265(14):7709-7712.

83. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276(5309):75-81.

84. Rheinwald JG, Green H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature*. 1977;265(5593):421-424.

85. McCawley LJ, O'Brien P, Hudson LG. Epidermal growth factor (EGF)- and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF)- mediated keratinocyte migration is coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9. *J Cell Physiol*. 1998;176(2):255-265.

86. Brown GL, Curtsinger L, Brightwell JR, et al. Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor. *J Exp Med*. 1986;163(5):1319-1324.

87. Brown GL, Curtsinger LJ, White M, et al. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta. *Ann Surg*. 1988;208(6):788-794.

88. Li Y, Fan J, Chen M, Li W, Woodley DT. Transforming growth factor-alpha: a major human serum factor that promotes human keratinocyte migration. *J Invest Dermatol*. 2006;126(9):2096-2105.

89. Cha D, O'Brien P, O'Toole EA, Woodley DT, Hudson LG. Enhanced modulation of keratinocyte motility by transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) relative to epidermal growth factor (EGF). *J Invest Dermatol*. 1996;106(4):590-597.

90. Mann GB, Fowler KJ, Gabriel A, Nice EC, Williams RL, Dunn AR. Mice with a null mutation of the TGF alpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell*. 1993;73(2):249-261.

91. Dlugosz AA, Cheng C, Williams EK, et al. Autocrine transforming growth factor alpha is dispensible for v-rasHa-induced epidermal neoplasia: potential involvement of alternate epidermal growth factor receptor ligands. *Cancer Res*. 1995;55(9):1883-1893.

92. Raab G, Klagsbrun M. Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1333(3):F179-199.

93. Sogabe Y, Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa O. Basic fibroblast growth factor stimulates human keratinocyte motility by Rac activation. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 2006;14(4):457-462.

94. Sasaki T. The effects of basic fibroblast growth factor and doxorubicin on cultured human skin fibroblasts: relevance to wound healing. *J Dermatol*. 1992;19(11):664-666.

95. Raja null, Sivamani K, Garcia MS, Isseroff RR. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2007;12:2849-2868.

96. Niu J, Chang Z, Peng B, et al. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-kappaB transcription factors. *J Biol Chem*. 2007;282(9):6001-6011.

97. Lee HS, Kooshesh F, Sauder DN, Kondo S. Modulation of TGF-beta 1 production from human keratinocytes by UVB. *Exp Dermatol*. 1997;6(2):105-110.

98. Mitra R, Khar A. Suppression of macrophage function in AK-5 tumor transplanted animals: role of TGF-beta1. *Immunol Lett*. 2004;91(2-3):189-195.

99. White LA, Mitchell TI, Brinckerhoff CE. Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1490(3):259-268.

100. Riedel K, Riedel F, Goessler UR, Germann G, Sauerbier M. Tgf-beta antisense therapy increases angiogenic potential in human keratinocytes in vitro. *Arch Med Res*. 2007;38(1):45-51.

101. Meckmongkol TT, Harmon R, McKeown-Longo P, Van De Water L. The fibronectin synergy site modulates TGF-beta-dependent fibroblast contraction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;360(4):709-714.

102. Wang Z, Gao Z, Shi Y, et al. Inhibition of Smad3 expression decreases collagen synthesis in keloid disease fibroblasts. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg JPRAS*. 2007;60(11):1193-1199.

103. Colwell AS, Phan TT, Kong W, Longaker MT, Lorenz PH. Hypertrophic scar fibroblasts have increased connective tissue growth factor expression after transforming growth factor-beta stimulation. *Plast Reconstr Surg*. 2005;116(5):1387-1390; discussion 1391-1392.

104. Yang L, Chan T, Demare J, et al. Healing of burn wounds in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in the epidermis. *Am J Pathol*. 2001;159(6):2147-2157.

105. Cordeiro MF, Reichel MB, Gay JA, D'Esposita F, Alexander RA, Khaw PT. Transforming growth factor-beta1, -beta2, and -beta3 in vivo: effects on normal and mitomycin C-modulated conjunctival scarring. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(9):1975-1982.

106. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci*. 1995;108 (Pt 3):985-1002.

107. Seishima M, Nojiri M, Esaki C, Yoneda K, Eto Y, Kitajima Y. Activin A induces terminal differentiation of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 1999;112(4):432-436.

108. Böttinger EP, Letterio JJ, Roberts AB. Biology of TGF-beta in knockout and transgenic mouse models. *Kidney Int*. 1997;51(5):1355-1360.

109. Bennett SP, Griffiths GD, Schor AM, Leese GP, Schor SL. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *Br J Surg*. 2003;90(2):133-146.

110. Uutela M, Wirzenius M, Paavonen K, et al. PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. *Blood*. 2004;104(10):3198-3204.

111. Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 1997;277(5323):242-245.

112. Rabhi-Sabile S, Pidard D, Lawler J, Renesto P, Chignard M, Legrand C. Proteolysis of thrombospondin during cathepsin-G-induced platelet aggregation: functional role of the 165-kDa carboxy-terminal fragment. *FEBS Lett*. 1996;386(1):82-86.

113. Margolis DJ, Cromblehome T, Herlyn M, et al. Clinical protocol. Phase I trial to evaluate the safety of H5.020CMV.PDGF-b and limb compression bandage for the treatment of venous leg ulcer: trial A. *Hum Gene Ther*. 2004;15(10):1003-1019.

114. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1994;269(43):26988-26995.

115. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995;376(6535):62-66.

116. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell*. 1993;4(6):637-645.

117. Mann A, Breuhahn K, Schirmacher P, Blessing M. Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization. *J Invest Dermatol*. 2001;117(6):1382-1390.

118. Tarnuzzer RW, Schultz GS. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 1996;4(3):321-325.

119. Low QE, Drugea IA, Duffner LA, et al. Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. *Am J Pathol*. 2001;159(2):457-463.

120. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2000;68(1):1-8.

121. Michel G, Kemény L, Peter RU, et al. Interleukin-8 receptor-mediated chemotaxis of normal human epidermal cells. *FEBS Lett*. 1992;305(3):241-243.

122. Villar-Fernandez MA, Lopez-Escamez JA. Outlook for Tissue Engineering of the Tympanic Membrane. *Audiol Res*. 2015;5(1):117.

123. Boedts D. The tympanic epithelium in normal and pathological conditions. *Acta Otorhinolaryngol Belg*. 1978;32(4):295-419.

124. Hong P, Bance M, Gratzer PF. Repair of tympanic membrane perforation using novel adjuvant therapies: a contemporary review of experimental and tissue engineering studies. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2013;77(1):3-12.

125. Lim DJ. Tympanic membrane. Electron microscopic observation. I: pars tensa. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1968;66(3):181-198.

126. Chole RA, Kodama K. Comparative histology of the tympanic membrane and its relationship to cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1989;98(10):761-766.

127. Lim DJ. Human tympanic membrane. An ultrastructural observation. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1970;70(3):176-186.

128. Gladstone HB, Jackler RK, Varav K. Tympanic membrane wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am*. 1995;28(5):913-932.

129. Somers T h, Houben V, Goovaerts G, Govaerts PJ, Offeciers FE. Histology of the perforated tympanic membrane and its muco-epithelial junction. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1997;22(2):162-166.

130. Reeve DR. Repair of large experimental perforations of the tympanic membrane. *J Laryngol Otol*. 1977;91(9):767-778.

131. Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol*. 1997;139(5):1349-1360.

132. Buyten J, Kaufman G, Ryan M. Effects of Ciprofloxacin/Dexamethasone and Ofloxacin on Tympanic Membrane Perforation Healing. *Otol Neurotol Off Publ Am Otol Soc Am Neurotol Soc Eur Acad Otol Neurotol*. 2007;28(7):887-890.

133. Ansel JC, Tiesman JP, Olerud JE, et al. Human keratinocytes are a major source of cutaneous platelet-derived growth factor. *J Clin Invest*. 1993;92(2):671-678.

134. Liu H, Mu L, Tang J, et al. A potential wound healing-promoting peptide from frog skin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;49:32-41.

135. Bernard JJ, Gallo RL. Protecting the boundary: the sentinel role of host defense peptides in the skin. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2011;68(13):2189-2199. doi:10.1007/s00018-011-0712-8

136. Niyonsaba F, Kiatsurayanon C, Chieosilapatham P, Ogawa H. Friends or Foes? Host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases. *Exp Dermatol*. 2017;26(11):989-998. doi:10.1111/exd.13314

137. Agerberth B, Charo J, Werr J, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*. 2000;96(9):3086-3093.

138. Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, et al. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology*. 2002;106(1):20-26.

139. Davidson DJ, Currie AJ, Reid GSD, et al. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004;172(2):1146-1156.

140. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock REW. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002;169(7):3883-3891.

141. Aksoy MA, Açıkalın MF, Gürbüz MK, et al. Efficacy of Platelet-Rich Plasma on Fat Grafts in the Repair of Tympanic Membrane Perforations: An Experimental Study. *J Int Adv Otol*. 2018;14(1):58-62.

142. Ozturk K, Yaman H, Cihat Avunduk M, Arbag H, Keles B, Uyar Y. Effectiveness of MeroGel hyaluronic acid on tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 2006;126(11):1158-1163.

143. Abbenhaus JI. The use of reconstituted bovine collagen for tympanic membrane grafting. *Otolaryngology*. 1978;86(3 Pt 1):ORL485-487.

144. Knutsson J, Bagger-Sjöbäck D, von Unge M. Distribution of different collagen types in the rat's tympanic membrane and its suspending structures. *Otol Neurotol Off Publ Am Otol Soc Am Neurotol Soc Eur Acad Otol Neurotol*. 2007;28(4):486-491.

145. O'Connor KN, Tam M, Blevins NH, Puria S. Tympanic membrane collagen fibers: a key to high-frequency sound conduction. *The Laryngoscope*. 2008;118(3):483-490.

146. Sadé J. Atelectatic tympanic membrane: histologic study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1993;102(9):712-716.

147. Mondain M, Ryan A. Histological study of the healing of traumatic tympanic membrane perforation after basic fibroblast growth factor application. *The Laryngoscope*. 1993;103(3):312-318.

148. Rodero MP, Khosrotehrani K. Skin wound healing modulation by macrophages. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010;3(7):643-653.

149. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003;83(3):835-870.

150. Kopecki Z, Luchetti MM, Adams DH, et al. Collagen loss and impaired wound healing is associated with c-Myb deficiency. *J Pathol*. 2007;211(3):351-361.