



**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**EFFÜZYONLU OTİTİS MEDİALİ ÇOCUKLARDA NİTRİK OKSİT SENTAZ
GEN POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Mehmet ATEŞ

KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr.Cengiz ÇEVİK

HATAY-2014

**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**EFFÜZYONLU OTİTİS MEDİALİ ÇOCUKLARDA NİTRİK OKSİT
SENTAZ GEN POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Mehmet ATEŞ

KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Cengiz ÇEVİK**

HATAY-2014

**Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
10862 proje numarası ile desteklenmiştir.**

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI

**SERÖZ OTİT TANILI ÇOCUKLARDA *Enos* DEHİDROGENAZ GEN
POLİMORFİZMİ ARAŞTIRMASI**

Dr. Mehmet ATEŞ

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

.....

Prof. Dr. Ömer Faruk KÖKOĞLU
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Ertap AKOĞLU
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

.....

Yrd. Doç. Dr. Cengiz ÇEVİK
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ

1. Prof. Dr. Ertap AKOĞLU
2. Doç. Dr. Şemsettin OKUYUCU
3. Yrd. Doç. Dr. Cengiz ÇEVİK

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
TEŞEKKÜR.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	x i
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Kulak Embriyolojisi.....	4
2.2. Kulak Anatomisi.....	5
2.2.1.Temporal Kemik	5
2.2.1.1 Squamoz Parça.....	6
2.2.1.2 Mastoit Parça	6
2.2.1.3 Petröz Parça.....	6
2.2.1.4 Timpanik Parça.....	7
2.2.2 Dış Kulak	7
2.2.3 Orta Kulak	8
2.2.4 Tuba Östaki.....	9
2.2.5 Orta Kulak Kemikçiklerin Anatomisi.....	10
2.2.6 İç Kulak	10
2.3 Effüzyonlu otitis media.....	11
2.3.1 Tanım.....	11
2.3.2 Epidemiyoloji.....	11
2.3.3 Fiziopatolojisi	12
2.3.4 Effüzyonun Mikrobiyolojisi	15
2.3.5 EOM da Klinik Tablo	15
2.3.6 EOM nn Sekel Ve Komplikasyonları.....	16
2.3.7 EOM de Tanı.....	16
2.3.8 EOM de Tedavi.....	17
2.3.8.1 Medikal Tedavi.....	18

2.3.8.2 Cerrahi Tedavi.....	22
2.4 Nitrik Oksit Ve Nitrik Oksit Sentaz	25
2.4.1 Nitrik Oksit Yapısı.....	25
2.4.2 Nitrik Oksit Sentaz Çeşitleri Ve Etkileri	27
2.4.2.1 Yapısal Tipe Özgü.....	28
2.4.2.2 Uyarılabilir Tipe Özgü.....	28
2.4.3 NOS enzimlerinin dokulardaki dağılımı.....	29
2.4.3.1 nNOS kaynaklı NO.....	30
2.4.3.2 eNOS kaynaklı NO.....	30
2.4.3.3 iNOS kaynaklı NO.....	31
2.4.4 iNOS sentezinin kontrolü.....	31
2.4.5 Nitrik Oksit Sentaz enziminin inhibitörleri	32
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1Materyal Metod.....	33
3.1.1. Olguların Seçimi.....	33
3.1.2. Moleküler Değerlendirme.....	34
3.1.2.1 DNA Eldesi.....	35
3.1.2.2 DNA Analiz Yöntemi.....	35
3.1.2.3 PZR İle İlgili Dizilerin Çoğaltılması	35
3.1.2.4 PZR Karışımının Hazırlanışı.....	36
3.1.2.5 Agaroz Jel Elektrophorezi	37
3.1.2.6 Restriksiyon Enzimi İle Kesim	37
3.1.2.7 Sonuçların istatiki yöntemle Analizi	37
4.BULGULAR.....	39
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇLAR.....	51
7. KAYNAKLAR.....	52
8. ÖZGEÇMİŞ.....	65

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 de. eNOS geni Glu298 Aspgen çok yapıllılığının incelenmesinde kullanılan primerler ve büyüklükleri.....	5
Tablo 2. Toplam hacim 20 µL olacak şekilde tepkime karışım oranları.....	5
Tablo 3. PZR tepkime koşulları.....	6
Tablo 4. Enzim Kesim Protokolü.....	32
Tablo 5: Hasta ve kontrol grubunun genetik analiz sonuçları.....	36

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Grupların cinsiyete göre dağılımı.....	4
Şekil 2: eNOS geni Glu298Asp polimorfizminin Gruplar arasındaki dağılımı....	17
Şekil 3: gen polimorfizmi ile cerrahi öyküsü arasındaki dağılım.....	39
Şekil 4: Adenoid vej. İle gen polimorfizmi arasındaki ilişki.....	40

KISALTMALAR

AOM	: Akut Otitis Media
cGMP	: Siklik Günozine Monofosfat
EDRF	:Endotel kaynaklı Gevşeme Faktörü
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
nNOS	: Nörönal Nitrik Oksit Sentaz
MM	: Milimetre
NO	:Nitrik Oksit
NOS	:Nitrik Oksit Sentaz
OM	:Otitis Media
LT	:Lökotrain
PAF	:Platelet Aktive Edici Faktör
SNİK	: Sensörinöral İşitme Kaybı
TM	: Timpan Membran
THB	: Tetrahidrobioptein
SOD	: Superoksit Dismutaz
FMN	: Flavın Mononükleotid

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam, klinik Anabilim Dalı başkanım Sayın Prof. Dr. Ertap AKOĞLU ‘na

Bilimsel ve mesleki deneyimlerinden faydalandığım, değerli hocam Doç. Dr. Şemsettin OKUYUCU’ ya

Tez çalışmam süresince her konuda desteğini, teorik ve pratikte değerli bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen tez danışmanım sayın hocam Yrd. Doç. Cengiz Çevik ‘ e

Eğitimime katkıda bulunan değerli hocalarım Yr. Doç. Dr. Ercan AKBAY, Yr. Doç. Dr. Gül SOYLU ÖZER ve Yr. Doç Dr. Cengiz ARLI ‘ ya

Tıbbi biyoloji Anabilimdalı başkanı Yrd. Doç. Dr. Bülent GÖĞEBAKAN ve ekibine tezdeki katkılarından dolayı teşekkür ederim

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım Mustafa Kemal Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Kliniğindeki asistan arkadaşlarım, hemşire ve personel arkadaşlara,

Kaybettiğim, doktor olmamı çok isteyen ama göremeyen, ancak sınırsız sevgi ve desteğini her an yanımda hissettiğim, canım babam Mustafa ATEŞ ‘e, fedakarlığıyla bizlere kol kanat geren sevgili annem Beğen ATEŞ ‘e, hayatıma neşe katan sevgili kardeşlerim Yasemin ATEŞ, Saniye ATEŞ ve Süleyman Şahin ATEŞ’e ve bu zorlu dönemde bana sürekli destek olan sevgili eşim Ayfer ATAV ATEŞ’e teşekkür ederim.

Dr. Mehmet ATEŞ

HATAY-2014

ÖZET

EFFÜZYONLU OTİTİS MEDİALİ ÇOCUKLARDA NİTRİK OKSİT SENTAZ GEN POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ

Amaç: Otitis media (OM), çocuklarda viral üst solunum yolu enfeksiyonlarından (ÜSYE) sonra en sık görülen hastalıktır. Ülkemizde effüzyonlu otitis media (EOM) prevalansı % 11.20 ile % 18.30 arasında değişmektedir. Bu kadar sık görülen bir hastalığın etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Literatürde çeşitli kulak patolojileri ile NO arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda işitme kaybı etiyolojisinde NO'nun önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Fakat NO'nun EOM hastalarındaki seviyesini ve durumunu eNOS Polimorfizmini değerlendirerek araştıran çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden çalışmamızda EOM'li çocuk hastalarda eNOS Polimorfizmini değerlendirmeyi amaçladık.

Metod: Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz (KBB) Polikliniğine başvuran ve effüzyonlu otitis media tanısı konulan 89 hasta ile yaş ve cinsiyet açısından uyumlu 85 sağlıklı birey çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların tamamına tam bir KBB muayenesi yapılmış ve hastalar ses ünitesinde odyolojik olarak değerlendirilmiştir. Rutin kan alımı esnasında çalışmaya katılanlardan 3-4 cc venöz kan alınmıştır. Kandan DNA analizi PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniği ile yapılmıştır. Elde edilen bulgular ki-kare testi ile istatistiksel değerlendirmeye tabi tutuldu.

Bulgular: Yapılan genetik analiz sonucunda; Hasta ve kontrol grubunun eNOS geni Glu298Asp polimorfizmi açısından (G/G, G/T, T/T) gruplar arasında istatistiksel fark olmadığı tespit edildi. Bu gruplar allel dağılımı açısından kıyaslandığında kontrol ve hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p=0.037$). EOM grubunda gen polimorfizmi açısından; Cinsiyet, aile işitme kaybı varlığı, cerrahi öykünün varlığı, alerjik rinit, adenoid vej. , sistemik hastalık varlığı, işitme kaybının şiddeti ve süresiyle anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edilmiştir. (sırasıyla: $p:0.369$, $p:0.550$, $p:0.390$, $p:0.805$, $p:0.606$, $p:0.857$, $p:0.989$, $p:0.432$.)

Sonuç: Bu sonuçlar ışığında G alleli taşımanın seröz otit gelişimine yatkınlığa neden olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Seröz otit, eNOS gen polimorfizmi, otitis media

ABSTRACT

Determinin Nos Gene polymorphism İn Childeren With Otitis Media With Effusion

Background and aim: Otitis media (OM), is the most prevalant disease after upper respiratory tract infections in children. The prevalnce of otitis media with effusion is found to be % 11.20 to % 18,3 in our country. In addition, %35- %70 of prescholl children suffers from acute otitis media at least once. The etiology of this common disease remains unclear. There are studies investigating effect of NO on the ear pathologies. In these studies, it was stated that NO played an important role in the etiology of hearing loss. However, there are no studies about the level of NO in OME (otitis media with effusion) and polymorphism of eNOS. Thus, we aimed to find the polymorphism of eNOS in children with OME.

Methods: Eighty nine patients diagnosed as OME at Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen School of Medicine, Department of Otorhinolaryngolgy were included in the study with an age sex matched 85 healty controls. All the subjects were underwent ENT (ear, nose, throat) examinations and odiologic assesment. Blood samples (3-4 cc) were obtained with the routine blood work. DNA analyses were performed with PCR. Chi-square was used to compare the groups statistically.

Results: The results showed that; The study group did not showed a statistical difference with the controls among the polymorphism of Glu298Asp of the eNOS gene (G/G, G/T, T/T). There was a statistical significance according to the distrubition of the allel genes ($p=0.037$). there was no signicance for the gene polymorphism in the group with OME among; sex, familial hearing loss, otologic surgery, alergic rhinitis, adenoid vegetations, systemic diseases, the intense and the duration of the hearing loss. ($p:0.369$, $p:0.550$, $p:0390$, $p:0.805$, $p:0.606$, $p:0.857$, $p:0.989$, $p:0.432$, respectively)

Conclusion: According to the results of this study, G allel carriers are prone to OME.

Key words: eNOS, polymorphism, otitis media with effusion

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Otitis media (OM), çocuklarda viral üst solunum yolu enfeksiyonlarından(ÜSYE) sonra en sık görülen hastalıktır(1).Ülkemizde yapılan insidans – prevelans çalışmalarında Effüzyonlu otitis media (EOM) prevalansı % 11.20 ile % 18.30 arasında değişmektedir (6). Ayrıca okul öncesi çocukların %35- %70'inin en az bir kez EOM atağı geçirdiğini gösterilmiştir (5)

Orta kulaktaki enflamatuvar olayların tamamı OM olarak adlandırılrsa da sınıflandırma patofizyolojik olarak yapılır. EOM ilk olarak 1755 tarihinde Wathen ve 1800'de Cooper tarafından tarif edilmiş, 1867'dePolitzer tarafından ayrıntılı olarak tanımlanmıştır. EOM akut enfeksiyon bulgularının olmaksızın orta kulak boşluğunda sıvı birikimi ile karakterize enflamatuvar bir hastalıktır(2). Orta kulak boşluğunda biriken sıvı seröz, hemorajik, pürülan, mukoid ve/veya bunların birkaçının kombinasyonları şeklinde olabilir. EOM efüzyonun süresine göre akut (3 haftadan kısa), subakut (3 hafta–3 ay arası) ve kronik (3 aydan uzun) olarak sınıflandırılır (3).

Etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamış olan EOM'da Orta kulakta submukozal bez, goblet hücrelerinin artış ve efüzyonun ortak patofizyolojik değişiklik olduğu savunulmaktadır (7). Ayrıca orta kulak boşluğunun havalanamamasına bağlı parsiyel karbondioksit basıncının ve kulağın negatif basıncının artması da patofizyolojide suçlanmaktadır (8).

EOM'da da dirençli orta kulak sıvısı kulak zarı hareketini azaltarak ses iletimine engellemektedir. Bu da hastada kendini kulakta dolgunluk ve işitme kaybı olarak gösterir (2).

EOM genellikle akut otitis media (AOM) takiben meydana gelmektedir. AOM'ların gerileme dönemindeeffüzyonların %50'si 4. hafta, %80'nide 8. hafta içinde iyileşmektedir (3). Fakat AOM'da üç aylık dönem sonrasında effüzyon düzelmezse (yaklaşık %10 hastada) EOM olarak kabul edilir ve efüzyon tedavisine başlanmalıdır (4).

EOM tedavisinde çeşitli medikal ajanlar ve cerrahi yöntemler kullanılmaktadır. Medikal tedavide antibiyotikler, lokal ve/veya genel dekonjestanlar, antiinflamatuvarlar ve antihistaminleri içeren birçok tedavi protokolleri kullanılmaktadır. EOM'nın cerrahi tedavisinde miringotomi, ventilasyon tüpü (VT) uygulaması yer alır. Cerrahi tedaviler arasında ise en çok tercih edilen yöntem ise VT uygulanmasıdır. VT takılmadan yalnız miringotomide yapılan hastalarda kulak zarında oluşturulan açıklık 1–2 günde kapanmaktadır.(4). Bu süre AOM tedavisinde yeterli olmasına rağmen EOM tedavisi için yeterli değildir. Armstrong EOM tedavisi için kulak zarında oluşturulan açıklığın minimum 2–3 hafta sürmesi gerektiğini belirtmiştir (5).

Çocukluk çağında çok sık karşılaşılan hastalıklardan olan ÜSYE, AOM ve EOM'da orta kulakta çeşitli enflamatuvar mediyatörler ve enzimlerde (histamin, prostaglandinler, Platelet aktive edici factor (PAF), proteazlar, hidrolitik enzimler lökotrienler, kinin, tümör nekrozis faktörü ve gamma interferonu) artış görülmektedir. Bu artışın hastalığın patofizyolojisinde etkili olduğu düşünülmektedir.

EOM'da artış gösteren enflamatuvar mediatörlerden olan PAF vucutta enflamatuvar ve aşırı duyarlılık gibi durumlarda salgılanır. Salgılanan bu mediatör ekstrasellüler sıvı ve ekstrelerinde yüksek konsantrasyonda bulunabilmektedir. PAF vücuttaki birçok hücre tarafından salgılanır fakat depolanamayıp sadece uyarı durumunda sentezlenir(6). Yapılan birçok çalışmada aşırı miktarda salgılandığında PAF'ın orta kulak epiteli ve koklea hücrelerinde nörotoksik etkisinin olduğu gösterilmiştir (11). EOM etiyopatogenezinde birçok enflamatuvar mediatörün rolü olsa da PAF'ın önemli bir yeri vardır. Yapılan son çalışmalarda PAF'ün nitric oxit sentaz (eNOS) salınımını arttırdığı ve Nitrik Oksit'in (NO) salınımına neden olduğu yapılan hayvan çalışmalarında bildirilmiştir (7). Rhee ve ark ise PAF'ün kokleaya NO aracılığıyla zarar verdiğini ve işitme kaybına neden olduğunu bildirmiştir (8).

Rose ve ark. effüzyonla beraber olan KOM'lı çocuk hastalarda Nitrik Oksit'in (NO) müsin salgılama yolağındaki önemli bir mediatör olduğunu ve işitme kaybının önemli bir nedeni olduğunu bildirmiştir (9). Aynı çalışmada yazarlar insan ve Chinchillaların orta kulak sıvılarında (NO₃⁻) anyonlar, NO radikal metabolitleri, yüksek nitrit konsantrasyonları (NO₂⁻) ve nitrat tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Paparella ve ark. KOM ve EOM'lı hastaların bazılarında sensörinöral işitme kaybı (SNİK) gözlendiğini ve bunun nedeninin tam olarak belli olmadığını bildirmişlerdir (10). Ayrıca yazarlar tiyol-

aktif toksin pneumolysin Corti, dış saç hücreleri (OHCs) organı ve destek hücrelerine zarar vererek işitme kaybına neden olduğu bildirilmiştir. Pneumolysin ototoksik etkisinde ise NO'nın önemli rol oynadığını ve OHCs'de hasar meydana getirerek SNİK'na neden olduğu bildirilmiştir (11).

NO üretilmesinde görev alan üç farklı NOS izoenzim tipi vardır. Bunlar Nöronal NOS (nNOS veya NOS-I), İndüklenebilir NOS (iNOS veya NOS-II), Endotelial NOS (eNOS veya NOS-III) dur (70). Ayrıca nNOS ve eNOS'a yapısal NOS denilir. Yapısal enzimlerin aktiviteleri Ca^{2+} /kalmodulin bağımlıdır. NOS konsantrasyonu sürekli bir şekilde dalgalanmalar gösterir dokudaki konsantrasyonlar eNOS ve nNOS tarafından kontrol edilir (70).

NOS enzimlerinin aktiviteleri P450 aktivitesine benzemektedirler, aktive olmaları koenzimlere bağlıdır. Bu enzimin fonksiyonel olabilmesi için eNOS'un dimerik yapıda olması gerekmektedir. eNOS'un dimerik hale gelebilmesi için ise HEM molekülünün enzime bağlanması gerekir. Dimerik hale geçen enzime, Tetrahidrobiopterin (THB) bağlanır ve oluşan dimerik yapı kararlı hale geçer. THB bağlanmamış bir dimer sadece O_2 üretebilirken bir THB bağlanmış eNOS molekülü hem O_2 hem de NO üretmektedir. Yüksek seviyede THB ise doymuş bir dimer oluşturarak sadece NO sentezleyen bir enzim meydana getirir (72).

Literatürde çeşitli kulak patolojileri ile NO arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar mevcuttur. İşitme kaybı etiyolojisinde NO'nın önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Fakat NO'nun EOM hastalarındaki seviyesini ve durumunu eNOS Polimorfizmini değerlendirerek araştıran çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden çalışmamızda EOM'li çocuk hastalarda eNOS Polimorfizmini değerlendirmeyi amaçladık. Bu çalışmanın literatüre katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Kulak Embriyolojisi

Embriyogenik gelişim açısından kulak dış, orta ve iç kulak olmak üzere üç bölgeye ayrılır. Dış, orta ve iç kulak embriyogenik olarak üç ayrı yerden ve üç ayrı germ yaprağından meydana gelmektedir. Dış kulak ve orta kulak üst solunum sisteminin ve sindirim sisteminin geliştiği brankial yarık ve ceplerden meydana gelmiştir. İç kulak ise, beyinde rhombencephalonun karşısına gelen dış ektodermden gelişir.

Brankial arklar solunum aygıtlarıdır. Bu arkların arasında oluşan oluklardan dış kulak ve orta kulak gelişmektedir. Bu nedenle de doğumdan sonra ortaya çıkan üst solunum yolları rahatsızlıkları çok yakından ilişkilidirler.

Östaki borusu ve orta kulak birinci endodermal cebin dışa doğru gelişmesinden oluşur. Orta kulak 3. haftada gelişmeye başlar. 4. haftadan sonra östaki borusu ve orta kulak birbirinden ayrılır. 30. haftada orta kulağın gelişimi yaklaşık olarak tamamlanır (12).

İç kulak 20. günde ektoderm yüzeyinde bulunan otik disk adı verilen bir alan olarak meydana gelmektedir. Disk içe doğru kıvrılır ve bunun sonucunda otik çukur oluşur, yüzey ile arasındaki bağlantılar kesilir ve 4. haftada otik vezikül meydana gelir. Otik vezikülün dorsomedial kısmından; semisirküler kanallar, utrikulus ve endolenfatik duktus meydana gelir ventral kısmından ise duktus, koklearis ve sakkulus meydana gelir. Fossa otika, otik vezikül haline meydana gelirken bir kısım epitel hücresi bu yapıdan ayrılarak statoakustik ganglionu meydana getirir. Bu gangliondan gelişen sinir lifleri makula, krista ve korti organına uzanırlar. Ektodermden meydana gelen membranöz labirentin etrafını mezodermden gelişen kıkırdak yapı sarar. Bu daha sonra ossifiye olur ve kemik labirenti meydana getirir.

İç kulak kemik yapıları ve kemikçikler embriyonel yaşamın 4. ayında yetişkin boyutlarına erişirler. Buna karşılık mastoid kemik ve kafa tabanı kemiklerinin gelişimleri doğumdan sonra da devam ederler. Bu durum özellikle östakiborusunun konumunda, yapısında ve kasların yapışmasında değişikliklerin ortaya çıkmasına sebep olur. Bu yüzden östaki borusunun çalışmasında çocuklarda büyüklere oranla bazı fonksiyon yetersizlikleri meydana gelmektedir (17).

2.2 Kulak Anatomisi

Denge ve işitmenin merkezi olan kulak, temporal kemik içerisine yerleşmiştir, kulak üç ayrı parçadan oluşmaktadır

1-Dış kulak

2-Orta kulak

3-iç kulak

Orta kulak dışta timpanik membran (TM) ve iç tarafta iç kulak arasındaki boşluktur. Tuba östaki ile nazofarenkse, aditus ad antrum ile mastoid antruma açılır. Orta kulağın hacmi yaklaşık olarak 0,5 cm³olarak kabul edilmektedir. Sınırları net olmayan bir prizmaya benzemektedir (13).

2.2.1 Temporal Kemik

Temporal kemik; sfenoid, oksipital, parietal, ve zigomatik kemik arasında yerleşmektedir. Bu nedenle aynı zamanda kafa tabanının bir parçasıdır. Temporal kemik dört ayrı parçadan oluşmaktadır.

- Skuamöz parça
- Mastoid parça
- Petröz parça
- Timpanik parça

2.2.1.1 Skuamöz Parça

Kafatasının yan duvarının büyük bir kısmını oluşturan temporal kemiğin skuamöz parçanın dış yüzeyine temporal kas tutunmaktadır. Burası önemli bir cerrahi klavuz yeri olan linea temporalis ile sınırlanır. Dış yüzünün arka üst kısmından A. Temporalis Media iç yüzünden ise A. Meningea Media geçmektedir. Dış yüzünde öne doğru uzanan ve masseter kasının yapıştığı Processus Zygomaticus bulunur. Skuamöz parçanın iç yüzü ortakafa çukuru ile komşudur (14).

2.2.1.2 Mastoid Parça

Mastoid parça temporal kemiğin arka ve üst kısmında yer alan ve temporal kemiği oluşturan parçaların en büyüğüdür. Mastoid kemiğin arka üst kısmında küçük bir kemik spin bulunur. Bu spine, suprameatal spin veya Henle spini denir. Mastoid parçanın iç yüzünde sigmoid sinüs yerleştiği sigmoid sulkus adı verilen bir oluk bulunur. Mastoid parçanın üst yüzeyinde tegmen mastoideum denilen ince bir kemik tabaka yer alır. Arkada, petröz parçanın arka yüzü ile birlikte arka kafa çukurunu yapar. Mastoid kemik hava boşluklarıyla doludur. Bu hava boşluklarının en büyüğü antrumdur (15).

Mastoidin pnömatizasyonu antrumdan skuamöz ve petröz kemiklere doğru yayılır. Bu iki kemik birbirinden petroskuamozal lamina ile ayrılmıştır. Bu kemik lamel zamanla ortadan kaybolur ancak bazen bu lamel kaybolmaz ve iki kemiği birbirinden ayırır. Buna Körner septumu denir (16).

2.2.1.3 Petröz Parça

Petröz kemik piramid şeklindedir ve iç kulak yapılarını içerir. Petröz kemik içinde fasiyal sinir, vestibulokohlear sinir, labirent, internal karotid kanal bulunur. Süperiorkısmı orta kafa çukurunu oluşturur. Bu kısım superior semisirküler kanal tarafından oluşturulan arkuat eminens tarafından belirlenir. Bunun önünde, genikulat ganglionun yer aldığı bir fossa bulunur. Bu fossadan öne doğru uzanan bir oluğun içinde

n.petrozus superfisialis major ve a. meninge media seyreder. Kemiğin arka yüzü önemli bir kılavuz noktası içerir. Bunlardan en belirgin olanı internal akustik kanaldır. Bu kanalın içinden 7. ve 8. kafa çiftleriyle a. auditiva interna geçer. Meatus akustikus internus'un lateral ucu krista falsiformis tarafından horizontal olarak ikiye ayrılır. Superior bölüm fasiyal siniri ve vestibüler sinirin üst dalını içerir. Inferior bölüm önde kohlear dalı arkada da vestibüler sinirin alt dalını içerir. Petröz kemiğin lateral yüzü orta kulağın medial duvarını oluşturur. Petröz apekte tentorium ve petröz arasında, 5. kafa çifti petröz parçanın içinden geçer(Meckel kovuğu). 6. kafa çifti, petröz ile sfenoidin eklem yaptığı yerin üzerinde olan bir çentiğin içinden geçer (Dorello kanalı)(17).

2.2.1.4 Timpanik Parça

Timpanik parça dışkulak yolunun anterior, inferior ve posterior duvarınınbüyük birkışımını oluşturur. Timpanik kemiğin üst kısmında rivinus çentiği denilen bir açıklık mecuttur. Kulak zarının pars tensası sulkus timpanikusa yerleşir halkanın açık olan kısmına ise; pars flaksida yerleşir (18).

2.2.2 Dış Kulak

Dış kulak, dış kulak yolu ve kulak kepçesi tarafından oluşturulur. Kulak kepçesi iperikondrium ile örtülü ince elastik bir kartilajdan oluşmuştur. Kulak kepçesi timpanik kemiğe, fibrokartilajinöz bir kanalla bağlanmıştır. Daha zayıf olarakta anterior, superior veposterior auriküler ligamentlerle çevre dokulara tutunmaktadır (19). Dış kulak yolu kavum konkadan timpanik membrana kadar olanbölümdür. Yaklaşık 2,5 cm uzunluğunda olan dış kulak yolunun dış 1/3'lük bölümü kıkırdaktan, geri kalan 2/3'lük iç bölümüise kemikten oluşmaktadır (20). Kulak zarı; dış kulağı orta kulaktan ayıran elips şeklinde oblik yerleşimli bir perdedir. Vertikal çapı yaklaşık olarak 9-10 mm, horizontal çapı ise 8-9 mm dir. Zarın kalınlığı ise yaklaşık olarak 0,1 mmdir. Kulak zarının timpanik kemikte yerleştiği yer olan sulkus timpanikusa"timpanik halka"denir. Kulak zarı anulus fibrosus ile timpanik halkaya bağlanır. Medialinden ise malleusun kısa koluna ve manibrium

malleiye bağlanır. Manibrium mallei'nin ucu içe doğru çökük olduğundan dolayı kulak zarının şekli konkavdır.

Kulak zarının en derin noktası manibrium malleinin ucunun olduğu bölgedir ve buraya umbo denir (21,22). Kulak zarı, pars tensa ve pars flaksida olmak üzere iki bölümden oluşur. Pars tensa timpanik kemik içerisindeki ses dalgalarıyla titreşen parçadır. Pars flaksida (Sharpnell zarı) ise timpanik kemiğin uzantıları arasındaki boşluk olan rivinius çentiğini doldurur. Bu iki parçanın gerginliğinde ve histolojisinde farklılıklar mevcuttur. Kulak zarı dışta skuamöz epitel, içte mukoza ve bu iki tabaka arasındaki fibröz tabaka meydana gelmektedir. Bu tabakalardan fibröz doku pars tensa kısmında bulunur iken flaksida da yoktur (23).

2.2.3 Orta Kulak

Timpanik membran ile kemik labirent arasında yer alan orta kulak; yüzeyi mukoza ile örtülü bir boşluktur. Orta kulağın ön-arka çapı yaklaşık 15 mm'dir. Mediolateral çapı ise superiorda 6 mm, umbo hizasında ise 2 mm'ye kadar düşmektedir. Orta kulak östaki tüpü aracılığıyla nazofarenks, aditus ad antrum ile mastoid havalı boşlukları, oval ve yuvarlak pencereler ile de iç kulakla bağlantı bir boşluktur. Orta kulakta bulunan diğer önemli bir yapı da dış kulaktan iç kulağa ses dalgalarının iletimini sağlayan kemişiklerdir. Orta kulakta malleus, inkus ve stapes olmak üzere üç adet kemişik bulunmaktadır. Bu kemişikler kulak zarı ile iç kulağın girişi olan ovalpencere arasında bir köprü oluşturarak iç kulağa iletilen ses şiddetini arttırmırlar. Kemişikleri orta kulak duvarlarına bağlayan iki adet kas (m. tensor timpani, m. stapedius) ve dört adet ligament bulunmaktadır (21,23). Doğumda orta kulak gelişimigenellikle tamamlanmıştır ve hacim olarak erişkin boyutlarındadır. Orta kulak topografik olarak üç parçada incelenir. Bunlar mezotimpanum, hipotimpanum ve epitimpanum'dur. Kulak zarı hizasındaki orta kulak boşluğuna mezotimpanum, altındaki kısma hipotimpanum, üstündeki kısma ise epitimpanum denir.

Orta kulak boşluğunun altı adet duvarı bulunmaktadır;

Tavan: Tegmen timpanioluştırur. Orta kulak boşluğunu orta kafa çukurundan ayırır.

Taban: Orta kulağın tabanı hipotimpanik resesi meydana getirir ve alt ön kısımda arteria karotis interna, alt arka kısımda juguler bulbusla komşudur(21, 24).

Ön duvar: İnternal karotisin yaptığı çıkıntı ile sınırlandırılmıştır ve bu bölgede östaki borusu ile m. tensör timpani yer alır.

İç duvar: Promontoryum ile iç kulakla komşuluk gösterir. Promontoryum Kohleanın bazal turunun yan duvarının yaptığı kabarıklıkadır. Bu yapının arka-üst kısmındaki çukurluğa fossula fenestra vestibuli (oval pencere) denir ve buraya Stapes tabanı yerleşmektedir. Promontoryumun arka-alt tarafında fossula fenestra cochlea (yuvarlak pencere) bulunur. Arka-üst kısmında ise processus cochleariformis bulunur ve m. tensör timpani buradan çıkar. M. tensör timpani processus cochleariformisten çıktuktan sonra 90 derece dönerek malleusun boynuna uzanır. Bu çıkıntı fallop kanalıyla çok yakın bir mesafededir ve fasiyal sinirin 1. ve 2. parçalarının birleşme noktasıdır.

Arka duvar: Mastoid ile yakın ilişkilidir. Bu bölgenin en önemli anatomik noktası ise stapestendonunun yapıştığı çıkıntı olan eminentia pyramidarum'dur. Eminentia'nın dışında bu bölgede fasiyal reses adı verilen bir çukurluk vardır, bu çukurun dış tarafında dış kulak yolu ve korda timpani, arka ve üstünde ise fossa incudis bulunmaktadır. Bu komşuluk posterior timpanotomi yapılacak hastalarda önem teşkil etmektedir(25).

Dış duvar: Dış duvarda skutum, kulak zarı ve hipotimpanum bulunmaktadır.

2.2.4 Tuba Östaki

Orta kulak boşluğunun ön duvarından başlayıp anterior, inferior ve mediale doğru ilerleyerek nazofarenkse açılan bir tüptür. Ortalama 3,5 cm uzunluğundadır. 1/3 dış kısmı

kemikten, 2/3 iç kısmı kıkırdaktan oluşmuştur. Kemik ve kıkırdak kısımlarının birleşme yeri olan istmus tüpün en dar yeridir. Tüpün isthmustan sonraki kıkırdak kısmı ise genişleyerek ilerler ve nazofarinkse açılır(26). Normalde kapalı olan östaki tüpü, M. tensor veli palatini ve M. levator veli palatini kaslarının kasılması ile açılır. Çocuklarda östaki tüpü erişkinlere kıyasla daha yatay, geniş ve kısa olduğundan enfeksiyonlara karşı yatkınlık meydana getirir.

2.2.5 Orta Kulak Kemikçiklerinin Anatomisi

Orta kulak boşluğunda üç adet kemikçik bulunur. Bunlar lateralden mediale doğru malleus, inkus ve stapes'tir. Bu kemikçiklerden zincirin başında yer alan malleus kulak zarına, sonunda yer alan stapes isfenestrestibülü'ye tutunmuştur. Ortada yer alan inkus ise iki kemikçik arasındaki bağlantıyı sağlamaktadır. Hareketli olan bu kemik zincirin görevi, ses dalgalarının timpanik membranda meydana getirdiği titreşimleri fenestra vestibülü aracılığıyla iç kulağa iletmektir (26, 27).

Kemikçikler arasında inkudo-malleolar ve inkudo-stapedial olmak üzere iki adet eklem yer alır. Ayrıca bu kemikçikleri orta kulak duvarlarına bağlayan iki adet kas ve dört adet de ligament bulunmaktadır. Dört bağdan üç tanesi malleusa aittir. Bunlar ön, üst ve dış malleolar ligamentlerdir. İnkusun ise tek bir bağı vardır(Ligamentum posterior)bu bağ, processus brevisi fossa inkudise bağlar. Kemikçiklere yapışan kaslar m. Tensor timpani ve m. Stapedius'tur(28, 29)

2.2.6 İç Kulak

Yuvarlak ve oval pencereler aracılığıyla orta kulak, kohlear ve vestibüler duktuslar aracılığıyla ise beyin ile ilişkili olan iç kulak petröz kemik içerisinde yer almaktadır. Kemik ve zar labirent olmak üzere iki kısımdan meydana gelmektedir. Kemiklabirentin çevresi otik kapsül denilen bir yapı tarafından sarılmıştır. Zar labirent ise, kemik labirentin içine yerleşir ve içi endolenf ile doludur. İç kulakta işitme ve denge

organları bulunmaktadır. Kohlea iç kulakta yer alan işitme organıdır. Denge organları ise yarım daire kanalları, utriculus ve sakkulus denen anatomik yapılardır (30).

2.3 Effüzyonlu Otitis Media;

2.3.1 Tanım

EOM akut enfeksiyon bulgularının olmaksızın orta kulak boşluğunda sıvı birikimi ile karakterize enflamatuvar bir hastalıktır (31). Effüzyonlu otitis media, serotimpanum, mukotimpanum, kataral otitis media, nonsüpüratif otitis media, zamlı kulak (glue ear) gibi farklı terminolojik terimlerle de ifade edilmektedir. Fakat yaygın olarak effüzyonlu otitis media (EOM) ve seröz otitis media (SOM) terimleri kullanılmaktadır. Klinik olarak EOM genellikle AOM ataklarını takiben ortaya çıkmaktadır. AOM atağı sonrasında hastaların yaklaşık %50'sinde 4. haftada, %80'inde ise 8. haftada orta kulakta meydana gelen effüzyon kendiliğinden rezorbe olmaktadır (26). Fakat yaklaşık %10 hastada AOM'yı takiben orta kulakta meydana gelen effüzyonda üç ay içerisinde düzelmezse meydana gelmemektedir. Düzelme görülmeyen bu hastalar EOM olarak kabul edilir. Ayrıca EOM hastalığının süresine göre şiddetine bakılmaksızın da sınıflandırılmaktadır. Hastalığın süresine göre akut (3 hafta veya daha kısa), subakut (3 hafta–3 ay arası) ve kronik (3 aydan uzun) olarak sınıflandırılmaktadır.

2.3.2 Epidemiyoloji

EOM viral ÜSYE'den sonra çocukluk çağının en sık görülen rahatsızlıklarındandır. AOM atağı geçiren çocukların yaklaşık 1/3'ünde orta kulakta 4 ay ve/veya daha uzun süre kalıcı effüzyon meydana geldiği bildirilmiştir (32). Amerika Birleşik Devletleri'nde 6-12 yaş grubundaki çocuklarda yapılan kapsamlı bir çalışmada EOM insidansı %22 olarak rapor edilmiştir (32). Elde edebildiğimiz kaynaklarda Türkiye'de EOM insidansına yönelik net veriler bulunamamıştır.

EOM görölme sıklığını etkileyen çeşitli faktörler bildirilmiştir. Hastanın yaşı insidansda önemli bir faktördür. Çünkü beş yaşından sonra insidansın giderek azaldığı on yaşından sonra ise bu azalmanın daha belirgin olduğu bildirilmiştir. Fakat beş yaş altı çocuklarda iletim tipi işitme kaybının en sık nedenidir. Hastalık her iki cinsten de görülür fakat erkeklerde kadınlardan daha sıktır (32). Kreş, ev içinde aile bireyleri tarafından tütün maddelerinin tüketilmesinin ve kalabalık aile yapısı görölme sıklığı arttıran diğer bir etkenlerdir. EOM ataklarının çocuklarda ÜSYE'lerin en yüksek seviyelere ulaştığı kış ve ilkbahar aylarında da sık görüldüğü bilinmektedir (32). Anne sütü ile beslenmenin ise otitis media atak sıklığını azalttığını belirten birçok çalışma vardır (32).

2.3.3 EOM'nın Fizyopatolojisi

EOM patofizyolojisi net olarak aydınlatılamamıştır fakat etiopatogeneizde çeşitli faktörler suçlanmıştır. Bakteriyel, viral ve/veya alerjik inflamasyonların mukozal ödeme yol açtığı, oluşan bu ödemin mukosilyer aktivitede bozulmaya neden olduğu ve sonuç olarakta efüzyonun meydana geldiği bildirilmiştir (33). Adenoid vejetasyon (AV), yarı damak, nazofarenks tümörleri gibi östaki tüpünün ağzında obstrüksiyona neden olan patolojilerin ise östaki tüpünden drenajın bozulmasına bağlı orta kulakta efüzyon oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Bir diğer suçlanan faktör olan Radyoterapinin ise tuba östakide silier aktivitede bozukluğa yol açarak efüzyonun oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir (34, 35) EOM'da patofizyoloji her ne kadar net olarak ortaya konulamamış olsa da östaki tüpünün mukosilyer aktivitesinde ve/veya drenajında bozulmaya neden olan pek çok etken efüzyon oluşmasına sebep olmaktadır (33).

AV ile EOM arasındaki ilişki tam olarak netlik kazanmamıştır. Yapılan ilk çalışmalarda AV'nin östaki ağzını tıkayarak orta kulakta negatif basınç oluşturduğu ve bununla efüzyon ile sonuçlandığı düşünülmüştür. Fakat daha sonraki çalışmalarda mekanik obstrüksiyonun EOM'ye tek başına neden olmadığı, AV'nin nazal enfeksiyonlara neden olduğu ve bu durumda orta kulak enfeksiyon gelişimini kolaylaştırdığını gösterilmiştir. Ayrıca AV'nin nazofarenkste tıkanmaya yol açmasa bile kronik bir inflamasyona ve patojen kolonizasyonuna yol açtığı tespit edilmiştir (6, 35). AV'da kolonize olan patojenler; sümürme, burun kapalıyken yutkunma, aksırma ve

patent tuba gibi durumlarda orta kulağa taşınır. Daha sonra adenoid dousundaki mast hücrelerinden alerjik enflamatuar mediyatörler salınır ve lenfosit differansiasyonu yoluyla EOM oluşumunda rol alır (36).

AOM atakları, orta kulak mukozası üzerinde ciddi etkilere neden olmaktadır. AOM atağı sonra enfeksiyon bulguları olmayan vakalarda efüzyonun non-pürülan ve/veya persistans olarak devam ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir (6). Mukozadaki patojen artıkları, bireyin bağışıklık sistemi, mukosilier klirens, östaki tüpü fonksiyonları ve mastoid anatomisindeki farklılıklar bu süreçte önemli rol oynayan diğer faktörlerdir (6).

Enflamatuar mediyatörlerin ve bazı enzimlerin EOM patogenezinde etkili olduğu bilinmektedir. Bunlardan ön planda olanlar; lökotrienler, proteazlar, trombosit aktive edici faktör, histamin, prostaglandinler, kinin, tümör nekrozis faktör ve gamma interferon'dur. Bu mediatörlerin salgılandıklarında, damar geçirgenliğini ve orta kulaktaki sekretuar aktiviteyi artırarak orta kulakta efüzyona neden olduğu gösterilmiştir (36).

EOM'lı olgularda mastoid hava hücrelerinin sağlıklı bireylerle kıyaslandığında daha küçük olduğu gösterilmiştir (6). EOM, mastoid hücrelerin gelimini tamamlamadığı dönemde ortaya çıkmaktadır. Yetersiz mastoid havalanması, mastoid hücrelerinin mukozasında gerçekleştirilen gaz değişiminde bozulmaya neden olur. EOM tedavisinde uygulanan ventilasyon tüpünün orta kulağın ve mastoid hücrelerinin gelişimine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca mastoid hücre büyüklüğünün EOM prognozu üzerine olumlu etkisi olduğu birçok araştırmada ortaya koyulmuştur (6,35).

Yapılan birçok çalışmada sık geçirilen viral ÜSYE, aktif ya da pasif sigara içiciliği, alerji hem mukosilier aktiviteyi hem de normal östaki açıklığını etkileyerek efüzyona neden olabildiği gösterilmiştir (32).

Alerjinin EOM patogenezindeki rolü net olarak gösterilememiştir. Alerjinin EOM patogenezinde direkt etkiden çok aracı bir faktör olabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur (37). Alerjiye nedeniyle ortaya çıkan inflamasyon mukozal ödem yoluyla östaki tüpünde fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır. Ayrıca Alerjik reaksiyonun hedef dokularından birinin de orta kulak mukozası olduğu ve bununda orta kulakta effüzyon oluşumuna neden olabileceği düşünülmektedir (37).

Orta kulağın yeterince havalanamaması, orta kulaktaki basıncın dış ortama kıyasla negatif hale gelmesine neden olur. Daha sonra oluşan negatif basınca bağlı orta kulakta parsiyel karbondioksit basıncı artar. Bu basınç değişikliklerinin orta kulak mukozasındahücreseel seviyede birçok patolojik olaya neden olabildiği gösterilmiştir (34). Sekretuar hiperplazi veya metaplazi oluşumu bu patolojik değişikliklerden bazılarıdır. Orta kulak sisteminde salgı bezi hücresi olmadığı içinmeydana gelen değişiklikler bazı araştırmacılar tarafından metaplazi olarak ifade edilmiştir (34). Fakat orta kulak mukozasında salgı bezi hücrelerinin olabildiğini ve bu nedenle sürecin hiperplazi olarak adlandırılması gerektiğini belirten yazarlar da bulunmaktadır. Her ne kadar farklı tanımlamalar yapılsa da orta kulakta goblet hücresi ve submukozal bez sayısının ciddi oranda arttığı ve bunların aktif üretimi sonucunda efüzyonun oluştuğu düşünülmektedir (6,36).

Orta kulakta oluşan negatif basınç timpanik membranda retraksiyona ve orta kulakta bulunan vasküler yapılardan intrasellüler sıvının sızmasına neden olur (38). Orta kulak basıncı, östaki tüpünün açılması ve orta kulaktaki vasküler gaz alışverişi yoluyla sağlanır (39). Orta kulağın gaz değişiminin primer olarak orta kulak epitelyumundan difüzyonla sağlandığı gösterilmiştir (39). Mastoid hücre mukozasında gaz değişimiyle O₂ içeri girer; CO₂ ve azot dışarı çıkar. Her yutkunuşta östaki tüpünden geçen hava miktarı yaklaşık olarak 1 mikro litredir. Günde ortalama yutkunma sayısı 1000 olduğundan gün içinde östaki tüpünden geçen hava miktarı yaklaşık 1 ml'dir (40). Geçen havanın ortalama hacmi 5-10 ml olan orta kulak basıncını dengelemesi pek mümkün gözükmemektedir. Bundan dolayı ana gaz alışverişi mukozal kapillerlerden difüzyon ile sağlanır (40). Orta kulak havalanmasının bozulması pCO₂ de yükselmeye ve orta kulak mukozasında metaplaziye yol açar. Oluşan metaplazi orta kulakta salgı bezlerinde sayısal artışa ve devam eden süreçte efüzyon oluşumuna neden olmaktadır. Orta kulaktaki mukozal patolojide bu aşamada düzelme olmazsa mukus salgılayan bezlerde atrofi gelişmekte ve bunun sonucunda salgı tamamen durmaktadır. Salgının durması ise orta kulakta negatif basınç oluşması ve timpanik membranda retraksiyon ve atelektazi gelişmesi ile sonuçlanmaktadır (40).

Politzer 1867 de orta kulakta efüzyon oluşumuna yönelik hidrops ex-vacuo teorisini ortaya atmıştır. Bu teoriye göre östaki tüpünde oluşan fonksiyon bozukluğu ve buna sekonder oluşan negatif basıncın orta kulak boşluğunda transüda oluşumuna sebep

olmaktadır (36,41,42). Ayrıca orta kulak efüzyonuna neden olan östaki tüp obstrüksiyonunun temel olarak mekanik ve fonksiyonel olmak üzere iki çeşit olduğu savunulmaktadır. Mekanik obstrüksiyon ise intrinsik ya da ekstrinsik nedenlerden dolayı olabilir. Mekanik obstrüksiyona neden olan İntrensek nedenler allerjideneneniyle oluşan östaki tüp membranının inflamasyonu ve tubal mukoza ödemidir. Ekstrensik nedenler ise adenoid vejetasyonu ve/ veya nasofarengeal benign ve malign tümörler gibi obstrüksiyon yapan kitleler olduğu bildirilmiştir (32). Fakat bu teorinin pek çok olguyu açıklamak için yeterli olmadığı bildirilmiştir (32). Adenoid dokusu östaki tüpünde drenajı engellemeyecek büyüklükte olan birçok hastada EOM meydana gelmesinin bu teoriyle açıklanamayacağı bildirilmiştir.

2.3.4 Efüzyonun Mikrobiyolojisi

Yapılan çalışmalarda kronik efüzyonlu otitis mediada (KEOM) %22 ile %52 arasında değişen oranlarda bakteri tespit edilmiştir. Tespit edilen bakteriler AOM'de tespit edilen bakterilerle korelasyon göstermektedir; *S. Pneumonia*, *H. Influenza*, *M. Catarrhalis* ve *A grubu B hemolitik streptokoklar* en sık gözükenerleridir. Daha az sıklıkta *stafilokoklar*la karşılaşmaktadır. Bazı çalışmalarda hastalarda *anaerob* bakteri oranı %0-10 saptanmıştır. EOM' li bazı hastalarda *H. Pylori* de saptanmıştır (43).

2.3.5 EOM da Klinik Tablo

EOM'de hastalarda genellikle ateş, halsizlik gibi enfeksiyon belirtileri görülmez. Hastalar genellikle dışardan gelen sesli uyarılara tepki vermeme, okulda derslere katılımın azalması ve yüksek sesle televizyon seyretme gibi işitme azlığı şikâyetleriyle hekime başvururlar. Çoğu aile çocuklarında işitme azlığının geçirilen gribal bir enfeksiyonu takiben ortaya çıktığını ifade eder (26). Bu şikâyetleri büyük çocuklar genellikle kendileri fark edebilir fakat küçük yaştaki çocuklarda atlanabilmektedir (26). Her ne kadar iki taraflı EOM'de işitme kaybı daha erken tespit edilse de EOM sıklıkla erken yaşlarda iki taraflı görülme eğilimindedir. EOM'nin işitme, algılama, lisan, dinleme

ve iletişim yetenekleri üzerine olumsuz etkileri bulunmaktadır. Bundan dolayı tanı ve tedavinin erken yapılması önemlidir. EOM'ya bağlı ortaya çıkabilen 25 db – 40 db'lik işitme kayıplarının dil ve algılama sorunlarına yol açabildiği gösterilmiştir (26). Bu da çocuklarda öğrenme, derslerde başarısızlık ve konuşma problemlerine sebep olabilir. İşitme ve öğrenme gibi sosyal problemlerin yanında EOM'lı çocukların dengesizlik ve sakarlık sorunu yaşadığı da bilinmektedir (44).

2.3.6 EOM nın Sekel Ve Komplikasyonları

Sekeller;

- Sensörinöral işitme kaybı
- İletim tipi işitme kaybı
- Konuşma bozuklukları
- Kolesterol kistleri
- Miringoskleroz / timpanoskleroz
- Retraksiyon ve retraksiyon cepleri
- Atelektazi/adezif otit
- Mastoit hücre atrofisi
- Osiküler nekroz
- TM Perforasyonu
- Aktif olmayan kronik otitis media
- Mastoid havalanmasının tam gelişmemesi

Komplikasyonlar;

- Kronik otitis media
- Kemik rezorpsiyonu ve erozyonu
- Latent mastoidit
- Kolesterol granüloamatözü
- Kolesteatom
- Vestibüler (gecikmiş) hidrops

2.3.7 Tanı

EOM tanısında en etkili ve yardımcı yöntem otoskopik muayenedir. Otoskopide normalde sedef renginde ve parlak olan kulak zarı, effüzyon varlığında mat kehribar renginde izlenir. Ayrıca sağlıklı zarın göstergelerinden olan ve kulak zarının ön alt kadranında görülen politzer ışık üçgeni EOM'da kaybolur. Kulak zarında kısmen retraksiyonlar meydana gelebilir. Sınırlı effüzyonlarda hava sıvı seviyesi izlenebilmektedir veya valsalva manevrası sonrasında kulak zarı arkasında hava kabarcıkları gözlenebilir. Fakat daha uzun süreli effüzyonlarda kulak zarı mat olarak izlenir. Pnömotik otoskop EOM tanısında önemli bir yere sahiptir. Dış kulak yoluna uygulanan basınç ile kulak zarının ve orta kulaktaki sıvının hareketleri Pnömotik otoskop ile gözlenebilir. Diyapazon testleri tanıya yardımcı olmaktadır. Uyumlu çocuklarda iletim tipi işitme kaybını ortaya koymada kullanılabilir. Diyapazon testi ile effüzyon olan kulakta rinne negatifliği gözlenir.

Saf ses odyometrisinde 25-45 dB arasında değişen iletim türü tipi işitme kaybı görülür. Ancak küçük çocuklarda bu testin güvenilirliği yüksek değildir (36). Uzamış EOM'de ise orta kulakta biriken toksik maddeler yuvarlak pencere aracılığıyla kokleaya geçerek uzun dönemde sensorinöral tipte işitme kayıplarına neden olabilir (36). Timpanometri SOM tanısında en çok kullanılan odyolojik tanı yöntemidir. Empedans odyometrisi ile yapılan ölçümde çoğunlukla B Tipi, yani yüksek bir pik yapmayan eğriler görülür. Yeni bir teknik olan Akustik reflaktometri ise timpanik membrana yollanan ses dalgalarının yansıma özelliklerini analiz ederek orta kulağın havalanması hakkında bilgiler verir (36).

2.3.8 Tedavi

EOM'nun tedavisinde de etiyopatogenezindeki gibi tam olarak bir fikir birliği sağlanamamıştır. EOM tedavisi genel olarak konservatif yöntemler, medikal tedavi yöntemleri ve cerrahi yöntemler olmak üzere üç ana başlıkta incelenebilir. Bu tedavilerin hepsinde de ortak amaç orta kulağı havalanmasını sağlamaktır.

2.3.8.1 Konservatif Yöntemler

İzleme, takip, sakız çiğnetme, valsalva manevrası yaptırma ve balon şişirme gibi yöntemlerdir. EOM'da konservatif tedavi uygulayacak hekimin en çok dikkat etmesi gereken şey hasta seçimidir. Tüm EOM hastalarına konservatif tedavi uygulanması uygun değildir. Bu tedavinin uygulanacağı hasta gruplarının özellikleri aşağıda sıralanmıştır;

1. Efüzyonlu otitis medianın tek taraflı olması
2. İşitme kaybının fazla olmaması (<20 dB)
3. Konuşmada gecikme olmaması
4. Timpanik membranda hava-sıvı seviyesi görülmesi fakat matlaşmanın meydana gelmemiş olması
5. Retraksiyonların olmaması
6. Akut otitis media ataklarının sık olmaması
7. Hastalığın ilkbahar ve/veya yazdönemde meydana gelmiş olması.

Yukarıda sayılan özelliklere sahip hastalar ek bir tedavi verilmeden konservatif yaklaşımla aylık takibe edilebilir. Bu hastaların 2/3 de ek bir tedaviye ihtiyaç duyulmadan effüzyonun kaybolduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (32).

2.3.8.2 Medikal Tedaviler

EOM'nın medikal tedavisinde; antibiyotikler, mukolitikler, antihistaminikler, dekonjestan ajanlar, nazal ve sistemik steroidler kullanılabilmektedir.

Antibiyotikler: EOM tedavisinde antibiyotik kullanımını hekimler arasında halen tartışmalıdır. Antibiyotik kullanımını önermeyen hekimler çoğunlukta olsada efüzyonların yaklaşık %50'sinde effüzyonda kültür pozitifliği olması nedeniyle antibiyotik kullanımını öneren hekimlerde bulunmaktadır (45). Yeni yapılan çalışmalarda PCR (Polimeraz Chain Reaction) gibi ileri yöntemlerin kullanılması ile orta kulak sıvısında bakteri pozitiflik oranını %70-80 olarak bildirenler bulunmaktadır (45). Fakat kültürde bakteri pozitifliği saptanan EOM hastalarında antibiyoterapiye cevabın zayıf olması ve olguların %65'inde üç ay içinde herhangi bir tedavi almadan effüzyonun gerilemesi antibiyoterapinin özellikle hastalığın başlangıç aşamasında gereksiz olduğunu düşündürmektedir. Yapılan bir klinik çalışmada EOM tedavisinde antibiyoterapinin etkinliği yaklaşık % 14-30 oranında bildirilmiştir (45).

Amerikan Otolarengoloji ve Baş Boyun Akademisi ve Amerikan Pediatri Akademisi'nin EOM için hazırladığı tedavi rehberinde ise EOM'da antibiyotiklerin uzun dönem etkinliğinin olmadığı ve rutin tedavide önerilmediği bildirilmiştir (5). Bu Akademilerin belirttiği tedavi şemasına göre; EOM tedavisinde ilk basamak hastanın üç ay takip edilmesidir. Daha sonra antibiyoterapi ve/veya ailenin cerrahi tedavi istemesi durumunda iki haftalık antibiyoterapinin denenebileceği belirtmiştir. Antibiyoterapinin daha uzun süre ve/veya birden fazla kullanımının fayda sağlamayacağı aksine nazofarinkste penisiline dirençli *S. pneumoniae* kolonizasyonlarına yol açabileceği gösterilmiştir(5). Yaz ve/veya ilkbahar aylarında meydana gelen AOM ve EOM da cerrahiden ziyade tıbbi tedavilere yer verilmesi gerektiği bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (34).

EOM antibiyoterapisinde orta kulak sıvısı kültürlerinde sık karşılaşılan bakterilere karşı etkili antibakteriyel ajanlar kullanılması önerilmektedir. Bunlar; amoksisilin (80-90 mg/kg/gün), amoksisilin/klavunat kombinasyonu (45 mg/kg/gün), trimetoprim-sülfametoksazol(8-40 mg/kg/gün), ikinci ve üçüncü kusak sefalosporinler (Sefuroksim

aksetil 60 mg/kg/gün, seftriakson 50 mg/kg/gün), makrolidler(Azitromisin 10 mg/kg/gün (1. gün)-5 mg/kg/gün (son 4 gün) ve klaritromisin 15 mg/kg/gün) dir (46).

Steroidler: EOM'de antibiyoterapi orta kulakta kolonize olan bakterileri ortadan kaldırırsa da inflamasyon bir süre daha devam etmektedir. Steroidler hem antiinflamatuvar etkileri ile devam eden bu enflamasyonun giderilmesine hem de EOM oluşmasında bakteriler için rezervuar olan adenoid dokusunun küçülmesine neden olmaktadır (47). Bu etkilerin yanı sıra effüzyonun oluşumunda alerjinin etkili olduğu hastalarda steroidlerin EOM tedavisinde etkili olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (47). EOM tedavisinde steroidler oral, intranazal ve/veya transtimpanik yollarla uygulanır (48). Klinik pratikte steroidler en sık nazal yolla kullanılmaktadır. Fakat steroid türü, dozu ve uygulama yeri ile ilgili kesin bir fikir birliği sağlanamamıştır. Amerikan KBB, Pediatri ve Aile Hekimliği akademilerinin EOM alt komitelerinin en son 2004 yılında hazırladıkları EOM'nin klinik tedavi rehberinde steroid tedavisinin EOM de rutin olarak kullanımı önerilmemektedir. Seçilmiş vakalarda antibiyotik ile kombine edilerek kullanılabileceği belirtilmektedir. EOM tedavisinde gerek antibiyoterapi gerekse de steroidler etkili olsalar da her iki tedavi seçeneğinin etkilerinin kısa süreli olduğu ve kalıcı olmadığı kabul edilmektedir (48).

122 çocuk üzerinde yapılan bir çalışmada antibiyotik tedavisine cevap vermeyen EOM' de tek başına intranazal steroid kullanımı ile efüzyonun anlamlı oranda rezolüsyona uğradığı ve adenoid hipertrofisinin altı haftalık takipten sonra gerilediği gösterilmiştir. Bu bulgulardan yola çıkarak nazal steroid tedavisinin geçici süre bile olsa cerrahiye alternatif olabileceğini ileri sürülmüştür (49) Fakat başka bir çalışmada EOM tedavisinde 12 haftalık takiplerde nazal steroid ile antibiyoterapinin kombine kullanılması ile tek başına antibiyoterapi kullanımı arasında anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir (50).

Mukolitikler: EOM'de orta kulak biriken sıvıda viskosite artışına sialomusin ve sulfomusin gibi glikoproteinler nenden olduğu bildirilmiştir. Mukolitiklerin mukus viskozitesinin azaltarak orta kulakta biriken sıvının östaki borusundan daha rahat direne olabileceği ve bu etkisinden dolayı EOM tedavisinde etkili olabileceği fikri ortaya

atılmıştır. Fakat yapılan klinik çalışmalarda mukolitiklerin EOM tedavisinde etkili olduğu gösterilememiştir (51).

Antihistaminikler: Her ne kadar EOM ile alerjik rinitin birlikte bulunduğu hastalarda dolaylı etkileri olduğu gösterilmiş olsa da EOM tedavisi üzerine direkt etkilerinin olmadığı bildirilmiştir (51).

Dekonjestanlar: Dekonjestanlar lokalve/veya sistemik yollaEOM da kullanılmaktadırlar. Fakat yapılan çalışmalar EOM tedavisinde dekonjestanların da anlamlı etkileri izlenmemiştir(51)

Lökotrien, PAF Antagonistleri ve Non-steroid Antienflamatuarlar: EOM'de orta kulakta araşidonik asit metabolitleri, serbest radikaller, sitokinler, platelet aktive edici faktör (PAF) gibi birçok enflamatuvar medyatörlerin varlığı saptanmıştır (52). Özellikle araşidonik asit metabolitleri, Leukotrienler (LT) ve PAF'ın EOM oluşumunda en önemli mediatörler olduğu gösterilmiştir (52). EOM oluşturulan deney hayvanlarında bu iki medyatörün inhibitörlerinin tedavide etkili olduğu gösterilmiştir(52).

Antioksidan Maddeler: Literatürde antioksidan ajanların EOM tedavisindeki etkilerine yönelik sınırlı bilgiler bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada; glutatyonun nazal sprey formunun 3 ay kullanımı ile efüzyonda %50 oranında rezolüsyon izlenmiştir. Fakat klinik pratikte bu ajanların EOM tedavisinde kullanılabilmesi için daha kapsamlı araştırmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu ve üzerinde durulması gerektiği belirtilmiştir(53).

Tubal Terapi: Fonksiyonel: tubal terapi EOM etiyopatogenezinde önemli bir yere sahip olan östaki tüp fonksiyonunu düzeltmeyi hedef alan bir tedavi yöntemidir. Tubal terapiaktif ventilasyon insuflasyon, immatür ve istenmeyen ağız hareketleri, yutkunma sıklığını arttırma, çene hareketlerinin aktivasyonu ve sakız çiğneme seçeneklerinden bir ve/veya birkaçını kombinasyonunu içeririr(51).

Aşılama: Aşılama tedavisi EOM ile ÜSYE arasındaki yakın ilişkiden doğmuş bir tedavi seçeneğidir. Literatürde bu ilişkiyi kanıtlayan çalışmalar bulunmaktadır (51). ÜSYE

ajanlarına karşı aşılmanın EOM'yı önlemede etkili olacağı düşünülmüş ve antiviral aşı uygulamasının birçok EOM vakasında olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (51)

2.3.8.3 Cerrahi Tedaviler

EOM hastalarına ne zaman cerrahi uygulama yapılması gerektiği tartışmalı bir konudur. Çünkü cerrahi tedavi EOM'da sekeli önlemek amacıyla uygulanmaktadır. Bundan dolayı cerrahi tedavi seçeneğini tartışmalı hale getiren temel sorun sekele gidişe ait bulguların neler olabileceği ya da yapılan önlemlerin sekel oluşumunu engellemek için yeterli olup olmayacağıdır(54). Bazı klinisyenler cerrahi tedavi seçeneğinkronik EOM'da uygulanmasını önermektedir. Kronik EOM ise ardı ardına yapılak aylık muayenelerin üçüncüsünde pnömatik otoskopide timpan membran hareketlerinde azalma ya da hareketin olmaması olarak tarif edilmiştir (55). Ayrıca İşitme kaybının 40 db in üzerinde ve bilateral olmasının hasta için önemli bir engel oluşturacağı ve kısa sürede müdahale etmeyi gerektirdiği bildirilmiştir. Timpan membranda retraksiyon, atelektazi, inkudostapediopeksiye gidiş gibi negatif basınç bulgularının olması ve/veya timpan membranda aşırı kalınlaşma ve effüzyonun koyuluğu da klinisyen için uyarıcı olmalıdır (55). Çünkü kronik EOM'lı hastaların tamamının sekelle sonuçlanacağı söylenemez. Timpanoskleroz gibi sekellerin yaklaşık dokuz ayda oluşmaya başladığını bildirilmiştir (55) . Fakat hastada effüzyonun ne zaman başladığı tespit edilemediğinden süreye bakarak girişimin ne zaman yapılması gerektiğini söylenmekte de tartışılmalı bir konudur.

EOM tedavisinde çeşitli cerrahi yöntemler kullanılmaktadır. Ventilasyon tüpü uygulaması en sık kullanılan cerrahi yöntemdir. Fakat her effüzyonlu hastaya uygulanması gerekli ve etkili değildir. Çünkü ventilasyon tüpü uygulanan hastaların uzun dönem takiplerinde hastaya her zaman çözüm sağlamadığı aksine çeşitli komplikasyonlara neden olabildiği bilinmektedir (56)

Sonuç olarak EOM'da cerrahi tedavi uygulanandığer tedavilere rağmen düzelmenin yeterli olmadığı hastalara ya da komplikasyonların önüne geçebilmek için yapılmalıdır.

Parasentez: Parasentez kulak zarına yapılan insizyon olarak tarif edilebilir. EOM cerrahi tedavisinde tek başına etkili olduğu düşünülmemektedir (57). Basit miringotomi çok kısa sürede kapandığı için yeterli miktarda orta kulak havalanmasını sağlamaz. Kısa süreli olarak semptomatik iyileşme sağlamanın yanında klinisyene ayırıcı tanıyada yardımcı olmaktadır. Tüp uygulamasını kabul etmeyen ailelerin çocuklarındageçici tedavi olarak denenebilir. Parasentez klasik olarak parasentez bıçağıyla yapılabildiği gibi lazer ile de yapılmaktadır. Lazer ile yapılan miringotomide oluşan kulak zarındaki perforasyon süresini klasik yöteme kıyasla daha uzundur (2-3hafta). Süre avantajının yanında kanamasız bir işlem olmasının yanında, kemikçik hasarı riskinin çok düşük olması, genel anesteziye gereksinimin olmaması; lazer miringotominin diğer avantajlarıdır. Maliyetinin yüksek olması ise lazer miringotominin dezavantajdır (57).

Ventilasyon Tüp Uygulaması: Yapılan medikal tedavilere rağmen 3 ay içerisinde düzelmeyen iki taraflı EOM'de ventilasyon tüpü uygulamasının uygun olduğu düşünülmektedir (56). Tek taraflı EOM'de ise bu süre 6 aya kadar uzatılabilmektedir. Timpan membranda ateletazi oluşmaya başlayan ve özellikle de retraksiyon bulunan vakalarda süreye bakılmaksızın ventilasyon tüpü geciktirilmeden uygulanmalıdır. Ayrıca retraksiyon varlığında ventilasyon tüpü retraksiyon olmayan en uygun bölgeye yerleştirilir (56).

Ventilasyon tüpü uygulamasının temel amacı orta kulağa yeterli miktarda hava girişini sağlayarak orta kulakta normal atmosferik hava basıncının sağlanmasıdır. Ventilasyon tüpünü takiben normal değerlere ulaşan basınca bağlı orta kulak mukozasında effüzyona sonucu artmış olan bez hücreleri kaybolur ve orta kulaktaki kronik inflamasyonda düzelme meydana gelir. Ventilasyon tüpünün kulak zarının antero-inferior kadranına takılması önerilir (58). Kulak zarında tüpün takılacağı alana parasentez yapılarak orta kulaktaki sıvı mümkün olduğunca aspire edilmelidir. Orta kulakta sıvı kalmadığı kanaatine varıldıktan sonra ventilasyon tüpü takılır. Parasentez işlemi esnasında ve/veya sonrasında kanama miktarının az olması ve görüş alanının ventilasyon tüpünü takmaya daha elverişli hale getirilmesi için parasentez timpanik membrandaki damarlara paralel yapılmalıdır. Ventilasyon tüplerininteflon, altın, titanyum, karbon, silikon ve hidroksiapetit gibi yapımında kullanılan malzemelere göre farklı çeşitleri bulunmaktadır (58). Ventilasyon tüpü uygulanan hastalarda en sık karşılaşılan

komplikasyonu, miringosklerozdur. Fakat miringosklerozun işitme üzerinde klinik semptoma neden olacak seviyede ciddi etkileri olmadığından önemsenmemektedir (58). Bir komplikasyon ise özellikle kulağın sudan korunmaması sonucu ortaya çıkan ikincil enfeksiyonlardır. İkincil enfeksiyonların tedasında topikal ve/veya oral antibiyotikler ve topikal steroidler kullanılmaktadır. Fakat uygulanan medikal tedavilere rağmen enfeksiyonun önüne geçilmezse tüp çıkarılmalıdır. Kulak zarında kalıcı perforasyonlar ventilasyon tüpü uygulamasının istenmeyen bir diğer komplikasyonudur. Literatürde kalıcı perforasyon oranları yaklaşık %1 olarak bildirilmiştir (56, 58). Tüpün tıkanması, sekonder akkiz kolesteatom, sensörinöral işitme kaybı, kemikçik zincirde hasarlanma, yüksek jugüler bulbus yaralanması, ektoptik karotid yaralanması, tüpün orta kulağa düşmesi ise daha nadir görülen diğer komplikasyonlardandır (56).

Hastaların yaklaşık % 3-4'ünde yapılan tüm tedavilere rağmen EOM'da tam bir düzelme sağlanamamaktadır (56). Bu hastalarda EOM'ye bağlı sekel ve komplikasyonlar gelişmektedir. Bundan dolayı cerrahi sonrası hastalar yakın takip edilmeli ve uygulanan tedavilere verdikleri yanıtlar değerlendirilmelidir. Cevap vermeyen olgular ise erken dönemde tespit edilerek daha ileri cerrahi yöntemler ile tedavi edilmelidir (56,58)

Adenoidektomi: Adenoid dokusu östaki tüpü ağzındamekanik tıkanıklık yaparak EOM oluşumuna neden olmaktadır. Adenoid dokusu orta kulak enfeksiyonları için bakteriyel rezervuar olduğundan orta kulak enfeksiyonu riskini azaltmak ve östaki tüpü ağzındaki mekanik tıkanıklığı ortadan kaldırmak için EOM'lı hastalarda adenoidektomi önerilmektedir (56). Fakat adenoidektominin komplikasyon riski ventilasyon tüpü uygulamasına kıyasla daha fazladır. Bu nedenle, uyku apnesi ve/veya sinüzit gibi adenoidektomi endikasyonları olmayan üç yaş altı hastalara EOM tedavisi için öncelikle ventilasyon tüpü uygulanması önerilmektedir (56). Tekrarlayan EOM'lı hastalarda ikinci kez tüp takılacak ise adenoidektominin cerrahiye eklenmesi gerektiği belirtilmektedir.

Timpanomastoidektomi: Ventilasyon tüp uygulamasına rağmen tedavide başarı sağlanamayan EOM olgularında mastoidektomi yapılabilir. Ventilasyon tüp uygulaması hastaların çoğunda işe yaramaktadır. Fakat bazı durumlarda tüpün atmasından kısa süre sonra effüzyon tekrarlamaktadır. Mastoid antrum ve hücrelerde granülasyon dokusu ve kolesterol granülomunun bulunduğu vakalarda mastoidektomi yapılmadan EOM tedavisinde başarı sağlanamayacağı bildirilmiştir (59).

Sonuç olarak EOM tanısı gecikmeden konulmalıdır. Çünkü tanıdaki gecikmeler hastalarda önemli komplikasyonlara neden olabilmektedir. Hastaya en uygun tedavinin vakit kaybetmeden uygulanması tanının doğru ve zamanında konulması kadar önemlidir.

2.4 Nitrik Oksit Ve Nitrik Oksit Sentaz

1985’li yılların başlarına kadar NO’nun basit bir atmosfer atığı olduğu düşünülmekteydi. 1987 yılında damar endotelinden endotel kaynaklı gevşeme faktörü izolasyonu sırasında endotelde nitrik oksit sentaz enzimi (NOS) keşfedilmiştir. Devam eden çalışmalarda da endotelyal kaynaklı gevşeme faktörünün, NO olduğu bulunmuştur(60, 61).

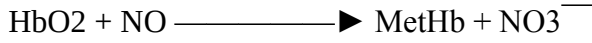
2.4.1 Nitrik Oksitin Yapısı

Nitrik oksit, renksiz gaz yapısında, serbest radikal özelliğine sahip bir moleküldür. Diğer radikallerin aksine (oksijen ve karbonmerkezli radikaller vs.), nitrik oksitte paylaşılmamış, elektron nitrojen atomu üzerinde yerleşik olarak bulunmaz. Fakat elektron; nitrojen ve oksijen atomlarının üzerinde lokalize olmayan bir şekilde bulunur. Nitrik oksit bu özelliği sayesinde kendi reaktivitesini baskılar, moleküler stabilitesini artırır ve biyolojik koşullarda sentezlendiği yerden daha uzak mesafelerde diffüzyona neden olabilir.

Dokuda oluşan NO’yu ortamdan uzaklaştırmak için özel bir enzimatik koruma mekanizması yoktur. Fakat bu durum, NO’nun uzun ömürlü bir bileşik olduğu anlamına gelmemektedir. NO, sahip olduğu reaktif özelliği nedeniyle protein yapıdaki bileşiklerle ya da diğer çeşitli bileşiklerle kolaylıkla tepkimeye girdiğinden 5-15 saniyelik bir ömre sahiptir. Bu süre boyunca zikzak şekilde hareketlerle 150-300 µm uzaklığa diffüzyonla rahatlıkla ulaşabilmektedir. Bundan dolayı 4-5 µm çapında olan hücreleri yaklaşık 2- 20 milisaniye içinde terk ederek komşu hücrelere hızlıca ulaşabilir ve her zaman konsantrasyonunun yüksek olduğu yerden düşük olduğu yere doğru diffüzyon yapabilir (62).

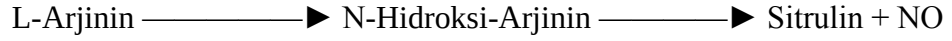
NO'nun kısa ömürlü olmasından iki mekanizma sorumludur. Bu mekanizmalardan biri kendiliğinden oksidasyon tepkimeleridir (62). NO molekülleri kendi aralarında ve oksijen molekülleriyle tepkimeye girmektedirler. NO'nun gaz fazı ve aerobik sulu fazda gerçekleşebilecek olan tepkimeleri sırasında önce bir grup reaktif nitrojen oksit türleri oluşur ve bu türler ortamdaki biyomoleküllerle tepkimeye girebilirler veya bu moleküller nitrit oluşturmak üzere yapısal olarak bozulurlar.

Normal koşullarda NO'nun dokudaki konsantrasyonun temel kontrolünü, NO ile oksihemoglobin arasındaki tepkime oluşturmaktadır. Dokudaki oksihemoglobin yüksek bir hızla NO ile tepkimeye girerek NO'yu inaktif formu olan nitrata oksitlemektedir(62).



NO'nun cGMP (Siklik guanilaz mono fosfat) üzerinden periferik dokularda güçlü bir vasküler vazodilatör olduğu 1979 yılında tanımlanmıştır(63). Endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olarak adlandırılan molekülün tanımlanması, memelilerde NO'nun sentezinin aydınlatılmasında çok önemli bir rol oynamıştır. EDRF'den önce asetilkolin(Ach), bradikinin ve ATP gibi bazı moleküllerin kan damarlarında dilatasyona neden olduğu ve bu etkinin ortaya çıkmasının endotel hücrelerinin varlığına bağlı olduğu biliniyordu. Damarlardan endotel hücrelerinin uzaklaştırılması vazodilatör etkiyi (Ach)önlemek veya azaltmaktaydı. Fakat damarlara endotel hücreleri intakt olan aortik parçalar uygulandığında vazodilatör etkinin (Ach) tekrar geri kazanıldığı tespit edilmiştir (65). Bunun gibi çalışmalara göre NO'nun EDRF'nin ömrünü ve etkisini uzatırken; superoksit, hemoglobin, metilen mavisi, demir (Fe²⁺) ve hiperoksidin EDRF'nin ömrünü kısalttığı ve aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (63).

NO sentezi için vücutta kullanılan öncül molekül arjinin aminoasididir. NO'nun arjininden sentezi, nitrik oksit sentaz(NOS) enzimi üzerinden iki aşamada gerçekleşir. Tepkimenin ilk aşamasında arjininin guanido nitrojeni (N ω) hidroksillenerek N ω -Hidroksi arjinin (N-OH-Arjinin) oluşur. Bu ara ürün stabildir ve istenirse tepkime ortamından rahatlıkla izole edilebilmektedir. Enzime sıkı bağlı olan ara ürün, ikinci aşamada sitrulin ve NO'ya dönüşmektedir.



NO çok yönlü biyolojik haberci bir moleküldür ve çok farklı biyolojik etkilere sahiptir. NO vücutta bir çok önemli görevi yerine getirir. Nörotransmisyon, vasküler tonusu düzenlenmesi, penil ereksiyon, immün sistemin düzenlenmesi, platelet agregasyonunun inhibisyonu, lökositlerin endotel hücrelerine yapışmaları ve bu hücrelerin enflamasyon olan dokuya göç etmeleri, damar geçirgenliğinin kontrolü, patojen hücrelere ve tümör hücrelerine karşı sitotoksikite, düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve kollojen sentezinin inhibisyonu bunlardan bazılarıdır (64, 65). NO, vazodilatasyona neden olarak bölgesel kan akımı ve sistemik kan basıncını düzenlemektedir. Ayrıcadamar endotelinde ateroskleroza önleyici etkisi de vardır(66, 67). NO'nun nitrik oksit gen transkripsiyonu, mRNA translasyonu ve sentez sonrası protein modifikasyonları üzerinde de etkileri mevcuttur. Yüksek miktardaki NO; parazitleri, tümör hücrelerini, yabancı mikroorganizmaları ve normal vücut hücrelerini öldürebilmekte ya da tahrip etmektedir (66). NO sentezinin kontrolü iki şekildedir; NOS-protein sentezinin üzerinden veya sentezlenmiş enzim aktivitesinin düzenlenmesi şeklinde olmaktadır (66).

2.4.2 Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Çeşitleri ve Etkileri

NO üretilmesinde görev alan üç farklı NOS izoenzim tipi vardır (68).

- Nöronal NOS (nNOS veya NOS-I)
- İndüklenebilir NOS (iNOS veya NOS-II)
- Endotelial NOS (eNOS veya NOS-III)

nNOS ve eNOS'a yapısal NOS da denilir. Yapısal enzimlerin aktiviteleri Ca^{2+} /kalmodulin bağımlıdır. NOS konsantrasyonu sürekli bir şekilde dalgalanmalar gösterir ve dokudaki konsantrasyonları eNOS ve nNOS tarafından kontrol edilir.

NOS'ın uyarılması iki şekilde gerçekleşmektedir; Yapısal tipe özgü ve indüklenebilirliğe özgü olarak iki şekildedir. Bunları açacak olursak ;

2.4.2.1 Yapısal Tipe Özgü Olarak

Önemli bir haberci olan asetilkolin, endotel hücresi üzerindeki reseptörüne yapışır ve gelen impulsla Ca^{2+} iyon kanalları açılarak, hücre içindeki Ca^{2+} düzeyi yükselir. Ardından Ca^{2+} 'nın kalmoduline bağlanmasıyla oluşan kompleks, yapısal enzim olan eNOS'u uyarır ve L arjinin'den NO ile sitrullin oluşturur. Uyarıya cevabın ani olması NO sentezini katalizleyen enzimin yapısal bir enzim olduğunu ve oluşan uyarıya yanıt için yeni bir protein sentezini gerektirmediğini göstermektedir. eNOS, aktivitesini gerçekleştirmek için kofaktor olarak NADPH ve Ca^{2+} /kalmoduline ihtiyaç duyar ve L-NMA (N-metil-L-arjinin) ve Nnitro- L-arjinin gibi arjinin analogları tarafından yarışmalı olarak inhibe edilir. Endotel hücresi tarafından sentezlenen NO, diffüzyonla düz kas hücrelerine geçer ve buradaki guanilat siklazı aktive edip cGMP seviyesini artırır ve sonuç olarak düz kaslarda gevşemeyi sağlar. Kalsiyum pompalarının sitoplazmik kalsiyum yoğunluğunu düşürmesi ile eNOS aktivasyonu sona ereceğinden eNOS tarafından kısa süreliğine ve düşük miktarda NO sentezi sağlanır. Bu durum nNOS için de geçerlidir. Konstitutif enzimlerin sentezi posttranskripsiyonel seviyede kontrol edilmektedir.

2.4.2.2 İndüklenebilir tipe özgü olarak

Burada lipopolisakkaritler ve sitokinler gibi ajanların Ca^{2+} 'dan bağımsız olarak NOS'u uyarmaları söz konusudur. Uyarının olduğu hücrede önceden NOS yoktur veya çok azdır. iNOS uyarıya veya Nukleer Faktor Kappa B gibi transkripsiyonel faktörlere cevap olarak sentezlenir (69). Bu tepkimeyi temelde oluşturan şey Kappa B'ye cevap veren elemanların iNOS promotor gen bölgesini uyarmasıdır. Bu reaksiyonlar ile; enfeksiyon, enflamasyon veya vasküler travma gibi durumlarda diğer iki NOS formunun ürettiğinin yaklaşık olarak 100-1000 katı kadar NO üretimi sağlanır. Bu mekanizma özellikle makrofajlarda aktif görev almaktadır. Bu tip enzim indüklenebilir NOS olarak adlandırılır. Bu olaylar sırasında oluşan NO nun dokudaki konsantrasyonu fizyolojik seviyeyi ciddi oranda geçmektedir. Eğer ortamda süperoksit anyon mevcutsa (O_2^-)

oldukça toksik bir bileşik olan peroksinitrit molekülü oluşmaktadır. Oluşan bu bileşik; hücrede lipit peroksidasyonu, DNA fragmentasyonu, plazma antioksidan miktarının azalması, protein hasar oluşumu ve endotelial düz kas gevşemesi gibi yollarla hücre hasar meydana getirmektedir. Peroksinitrit oluşumu; süperoksit ile süperoksit dismutaz (SOD) miktarına ve NO üretimi/tüketimi arasındaki dengeyle yakından ilişkilidir. Sonuç olarak düşük konsantrasyonlardaki NO'nun normal fizyolojik fonksiyonlar için önemli görevlerde bulunduğu, yüksek konsantrasyonlardaki NO'nun ise hücre üzerinde toksik etkilere neden olabileceği gösterilmiştir (69).

NOS enzimlerinin aktiviteleri P450 aktivitesine benzemektedirler, aktive olmaları koenzimlere bağlıdır. Bu tepkimedeki enzimler aktiviteleri için; FAD (Flavin adenin dinükleotit), FMN (Flavin mononükleotit), THB (Tetrahidrobiopterin) ve demir-protoporfirin IX yapısındaki hem grubuna gereksinim duyarlar. Bu enzimin fonksiyonel olabilmesi için eNOS'un dimerik yapıda olması gerekmektedir. eNOS'un dimerik hale gelebilmesi için ise HEM molekülünün enzime bağlanması gerekir. Dimerik hale geçen enzime, THB bağlanır ve oluşan dimerik yapı kararlı hale geçer. Tepkimenin olabilmesi, çinko iyonlarının sayısı ile de yakından alakalıdır. THB bağlanmamış bir dimer sadece üretebilirken bir THB bağlanmış eNOS molekülü hem O₂ hem de NO üretmektedir. Yüksek seviyede THB ise doymuş bir dimer oluşturarak sadece NO sentezleyen bir enzim meydana getirir (70).

2.4.3 NOS enzimlerinin dokulardaki dağılımı

Enzimin vucuttaki dağılımı fizyolojik durumlara göre değişiklik göstermektedir. Normal durumlarla patolojik durumlar arasında ciddi dağılım farkları mevcuttur.

2.4.3.1 nNOS kaynaklı NO

nNOS ilk kez merkezi sinir sisteminde tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarla NOS'un iskelet kası, periferik nöronlar, pankreasın β -adacıkları,

böbreklerdeki makula densahücrelerinde ve çeşitli epitelyum hücrelerinde değişik işlevleri olduğu tespit edilmiştir

Merkezi sinir sistemi: nNOS'un merkezi sinir sisteminde çok önemli görevleri mevcuttur. Temel görevi nöromodülatörlüktür. Bilinen en düşük molekül ağırlıklı organik nörotransmitterdir. Nöronal hücrelerde presinaptik uçtan salgılanan glutamatın etkisiyle (glutamat NMDA reseptörlerine bağlanır), postsinaptik uçtaki NOS'u aktifleştirilir. Böylece oluşan NO hedef hücredeki istenilen etki oluşur (71,72).

Sinir sisteminde özellikle koku alma, görme, ağrıyı algılama ve hafıza oluşması gibi birçok işlevlerde aktif rol oynamaktadır (71,73-75).

Periferik sinir sistemi: nNOS nonadrenerjik nonkolinerjik sistemde nörotransmitter olarak görev alır (73, 74). Temel olarak solunum fonksiyonlarında, penil ereksiyon, gastrointestinal sistem motilitesi ve sfinkter işlevlerinde ayrıca tüm dokuların kan basınçlarının ve akış hızını düzenlenmesinde rol alır (76-79).

2.4.3.2 eNOS kaynaklı NO

eNOS en çok vasküler epitel hücrelerinde bulunur. İmmunokimyasal yöntemle böbrek tübül hücrelerinde de olduğu tespit edilmiştir. Hücre içerisinde sitoplazmada görev almaktadır. Hücre içinde en sık golgi cisimciği, plazma membranı ve en fazlada plazmalemmal kaveolada bulunduğu tespit edilmiştir. eNOS kaveolada kaveolin kaplayıcı proteinle sarılıdır ve inaktif haldedir. Hücre içindeki serbest kalsiyumun miktarının artmasıyla enzim bu proteinden ayrılır ve aktif hale gelir. Hücredeki serbest kalsiyum düzeyi düşene kadar enzim aktif halde kalır. Aktive olmuş enzim ortamda L-arjinin, O₂ ve NADPH olduğu müddetçe aktif haldedir. Hipoksi, östrojen gibi bazı hormonlar yükseltgenmiş düşük dansiteli lipoproteinler ve mekanik güç gibi faktörler bazal üretimi etkileyebilmektedir (80-83).

Düz kaslarda dilatasyona neden olarak kan akışını ve kan basıncını düzenler(84, 85).Trombositlerin agregasyonunu ve adezyonunu inhibe eder (86,87). Endotel hücrelerinde ve düz kas hücrelerinde proliferasyonu inhibe eder (88).

2.4.3.3 iNOS kaynaklı NO

iNOS un sentezi uygun sitokinler ve lipopolisakkaritlerle uyarılmasına bağımlıdır. Uygun uyarılar yapıldığında makrofajlar, kondrositler, miyokardiyum, damar epitelyum hücreleri, düz kas hücreleri ve diğer hücreler ile dokular tarafından sentezlenebilir. Bu indüksiyon sonucu oluşan iNOS koenzimlere gereksinim duymadan kalmodulin molekülünü güçlü bir şekilde bağlar. iNOS enzimi bulunduğu ortamda substrat kısıtlaması olmadıkça veya enzim protein olarak yıkılmadıkça her zaman aktiftir ve iNOS bulunduğu ortamda uzun süreli ve yüksek derişimde NO sentezini katalizler.

2.4.4 iNOS sentezinin kontrolu

iNOS aktivasyonu DNA düzeyinde kontrol edilir ve bu özellik diğer izoformlar ile iNOS arasındaki temel farkı oluşturur. Hücrede indüksiyon mevcut değilse iNOS aktivitesi ölçülemeyecekkadar azdır. Lipopolisakkaritler, IL-1, IF-gama, TNF-alfa en önemli indükleyicilerdir. Bazı inhibitör sitokinler ve büyüme faktörleri ise iNOS sentezini baskılar. iNOS indüksiyonu çeşitli enflamatuar hastalıklarda arttığı tespit edilmiştir. Bu sitokinlerin hiçbirisi yalnız başına maksimum indüksiyonu sağlayamazlar. Etkin iNOS induksiyonu için IF-gama, IL-1beta ve TNF-alfa karışımı gerekmektedir. Tüm bu indüksiyonlara rağmen daha önce anlatıldığı gibi enzime kalmodulinin bağlanması için ortamda Ca^{2+} olması gerekmektedir(86).

2.4.5 Nitrik Oksit Sentaz enziminin inhibitörleri

Yapılan çalışmalarda çeşitli arjinin analoglarının aktif makrofajların sitotoksik etkilerini belirgin oranda azalttığı gösterilmiştir. Arjininin guanido grubuna kimyasal grupların takılması ile hazırlanan analogları NOS enziminin en etkili inhibitör grubunu oluşturmaktadır. Bu analoglar tek tüm NOS izoformlarını inhibe etmektedir. Bilinen en etkili inhibitör N-metil arjinin (L-NMA) dir. Bu bileşik aktive olmuş makrofajların arjinin bağımlı sitotoksik etkilerini argininle yarışmaya girerek enzimi inhibe ederler. Diğer

önemli inhibitörler; Nitroarginin (L-NMA), Nitroarjinin metil ester (L-NAME) dir. Bu inhibitorlerin kullanılmasının amacı NO sentezi sonucu oluşacak toksisiteyi engellemektir. Üç NOS izoformunda da bu durumlar izlenebilmektedir. Örneğin serebral iskemide hücrelerde artan Ca^{2+} , nNOS'u aktive ederek beyinde toksik etkiye neden olur. Özellikle anaflaktik reaksiyonlarda aktive olan eNOS vazoaktif süreçte NO sentezini artırır. Fakat daha yaygın olarak artan NO sentezinin ana nedeni iNOS'tur. Çünkü bu izoform sentezlendikten sonra üretimi kontrol edilemez ve lokal olarak NO derişimini ciddi oranlarda artırabilir. Bunun sonucu oluşan NO damar geçirgenliğini artırır ve şiddetli hipotansiyona neden olur. İzoformspesifik inhibitörlerin izole edilmesi ve bu inhibitorlerin klinikte tedavi amacıyla kullanılmasını daha güvenli hale getirir (81).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Materyal Metod

Bu çalışma için Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Yerel İnsan Etik Kurulundan 28.05.2013 tarihli, 2013/102 nolu onay alındı. Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz (KBB) Polikliniğine başvuran ve effüzyonlu otitis media tanısı konulan 89 hasta ile yaş ve cinsiyet açısından uyumlu 85 sağlıklı birey çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların tamamına tam bir KBB muayenesi yapılmış ve hastalar ses ünitesinde odyolojik olarak değerlendirilmiştir.

3.1.1. Olguların Seçimi

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı polikliniğine başvuran ve EOM tanısı konulan 45'i bayan ve 44'ü erkek olmak üzere toplamda 89 hasta ve 51 erkek ve 34 kadın sağlıklı bireye yapılmıştır. Hasta bilgileri kliniğimizde standart olarak doldurulan Değerlendirme Formuna kaydedilmiştir. Çalışma sonrasında bu formdaki bilgiler kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı bireylerden rutin kan alınımı sırasında EDTA'lı tüplere 5-7 ml kan alınmıştır. Alınan kanlar kullanılacağı zamana kadar Tıbbi Biyoloji ve Genetik laboratuvarında -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Bu araştırmada çalışma dışı bırakılma kriterleri:

- Odyolojik değerlendirmeye uygun olmayan mental ve/veya fiziki rahatsızlığı olanlar
- Dış, orta ve iç kulak ile ilgili anatomik problemi ya da hastalığı olan olgular
- Geçirilmiş kulak ameliyatı hikayesi olan olgular

- Nörootolojik müdahale yapılan olgular
- Ailesel ve/veya kronik metabolik rahatsızlığı olanlar
- Radyoterapi gibi nedenlerle EOM meydana gelmiş olan vakalar
- Tanı sırasında kulak ve/veya diğer vucüt bölgelerinde aktif enfeksiyonu olanlar
- Çalışmaya katılmayı kabul etmeyenler

3.1.2 Moleküler Değerlendirme

3.1.2.1 DNA Eldesi

I. Gün

EDTA'lı tüpe alınmış kanların odası sıcaklığında bekletildikten sonra üzerlerine hacimleri kadar saf su eklendi. İyiçe alt üst edildikten sonra 4000 devir/dakika'da 20 dakika santrifüj edildi ve üstteki sıvı kısım atıldı. Bu işlem üç kez tekrar edildi. Üçüncü santrifüjün ardından, atılan sıvı kısmın yerine her bir tüpe 3 mL üreli parçalama çözeltisi eklendi ve çökeleğini iyice çözünmesi sağlandı. Ardından 400 µL %20'lik SDS ve 100 µL 10mg/mL proteinaz K eklenerek 37 °C'de 1 gece için inkübasyona bırakıldı.

II. Gün

İnkübasyondan çıkarılan örneklerle 2 mL 5M NaCl eklendi ve 10-15 dakika alt üst edildi. Ardından, üzerlerine 8 mL kloroform konularak 4000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan 3 kısımdan üstteki kısım temiz bir tüpe alınarak, üzerine hacmi kadar soğuk %96'lık etil alkol eklendi. Alkol ilavesi ile çöken DNA'lar pipet ucu ile 1,5mL'lik santrifüj tüpüne alınarak üzerlerine 1000 µL %70'lik etil alkol eklendi. Tüpler 13000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edilerek DNA'ların tüpün dibine yapışması sağlandı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. En son santrifüj işleminden sonra, alkol dikkatli bir şekilde döküldü. Tüplerin dibine yapışması sağlanan DNA'lar vakumlu

kurutucu da yarım saat bekletildi ve üzerlerine gerekli miktarlarda deiyonize steril su eklendi. Birgün +4°C’de bekletilerek çözünmesi sağlanan DNA ’lar saklanmak üzere -20°C’lik derin dondurucuya kaldırıldı.

3.1.2.1 DNA Analiz Yöntemi

Bu çalışmada DNA analizi için kullanılan PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniği, ilgilenilen gen bölgesinin canlı dışı ortamda çoğaltılmasına dayanan, pratikliği ve güvenilirliği ile günümüzde moleküler biyolojik çalışmalarda en sık kullanılan tekniklerden biridir.

eNOS geninin ilgili bölgelerinin çoğaltılması işlemi in-house türü MJ Research PTC-200 PZR cihazı ile gerçekleştirildi. PZR tepkimesi için gerekli karışımların tümü otoklavlanmış malzemeler kullanılarak biyolojik emniyet kabininde hazırlandı.

3.1.2.2 PZR ile İlgili Dizilerin Çoğaltılması

Bu çalışmada eNOS geni Glu298 Asptek nükleotid değişimi yapısal bölgesinde yer alan tek nükleotid değişimi tablo 1’de verilen primerler kullanılarak PZT yöntemiyle belirlendi.

Tablo 1 de. eNOS geni Glu298 Asp gen çok yapıllılığının incelenmesinde kullanılan primerler ve büyüklükleri

Nükleotid değişimi		Primer uzunluğu (nükleotid)	Nükleotid dizisi	Ürün (baz çifti)
eNOS	Fw	22	5-AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA-3	248
	Rw	24	5-CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA-3	

3.1.2.4.PZR Karışımının Hazırlanışı

PZR tepkimesinde kullanılan primer çiftinin en verimli çalışabileceği erime sıcaklıklarının (T_m) tespit edilmesi ve tepkime koşullarının iyileştirilmesi amacı ile ilk olarak örnekler içerisinde seçilen 1 DNA örneği ile eNOS primer takımı için iyileştirme ve gradient PZR yapıldı. Seçilen örnek için 10 μ 'lık hacimde gerçekleştirilen gradient PZR neticesinde en uygun T_m değeri elde edildi. Uygun T_m değeri belirlendikten sonra Tablo 2 'de verilen miktarlar kullanılarak reaksiyon hacmi 20 μ l'ye çıkarıldı ve çalışmaya dâhil edilen örneklerin ilgili bölgeleri çoğaltıldı.

Tablo 2. Toplam hacim 20 μ L olacak şekilde tepkime karışım oranları.

Eklenen kimyasal madde	Miktarı (μ l)
Distilesu	13,9
10X Taq buffer	2.4
25mM $MgCl_2$	1,2
2mM dNTP mix	1.6
100 mM Primer Fw	0,16
100 mM Primer Rw	0,16
Taq polimeraz (5u/ μ l)	0,08
DNA	0.5
Toplam	20

Tepkime koşullarına ait değişkenler tüm tepkimelerde aynı tutulmuştur (Tablo 2). Elde edilen ürünler RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi ile çok yapılilik yönünden araştırıldı.

Tablo 3. PZR tepkime koşulları.

Basamak	Sıcaklık	Süre	
İlk denatürasyon	94 °C	5 dakika	
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	30 döngü
Bağlanma	Tablo 'deki değerler	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son uzama	72 °C	5 dakika	

3.1.2.5 Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi PZR tepkimelerinin verimli çalışıp çalışmadığının kontrolünde kullanıldı. Örnekler, yüzde 1 oranında hazırlanmış olan agaroz jelde 90 voltta 40 dakika kadar (37–501 bç aralığında) pUC19 MspI kesimi DNA belirleyici eşliğinde yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak UV ışık altında görüntülendi.

3.1.2.6 Restriksiyon Enzimi (RE) ile Kesim

eNOS geni Glu298Asp gen çok yapıllılığının incelemek için tablo 4’de verilen primerler kullanılarak yapılan PZT örnekleri BanII restriksiyon enzimi üretici firmanın direktifleri doğrultusunda kullanılarak kesildi. 0.2 ml’lik mikro santrifüj tüplerine 10 µ PZR ürünü konuldu. Tablo 4’da belirtilen ölçülerde hazırlanan karışımdan PZR ürününü ihtiva eden her tüpe 5 µl konuldu.

Tablo 4. Enzim Kesim Protokolü

İçerik	Miktarlar (µl)
Distilesu (dH2O)	3,4
10X RE tamponu	1,5
BanII Restriksiyon kesim enzimi	0,1
PZR ürünü	10
Toplam	15

Hazırlanan karışımı içeren tüpler tablo 4’deki koşullarda kesim işlemine tabi tutulur.

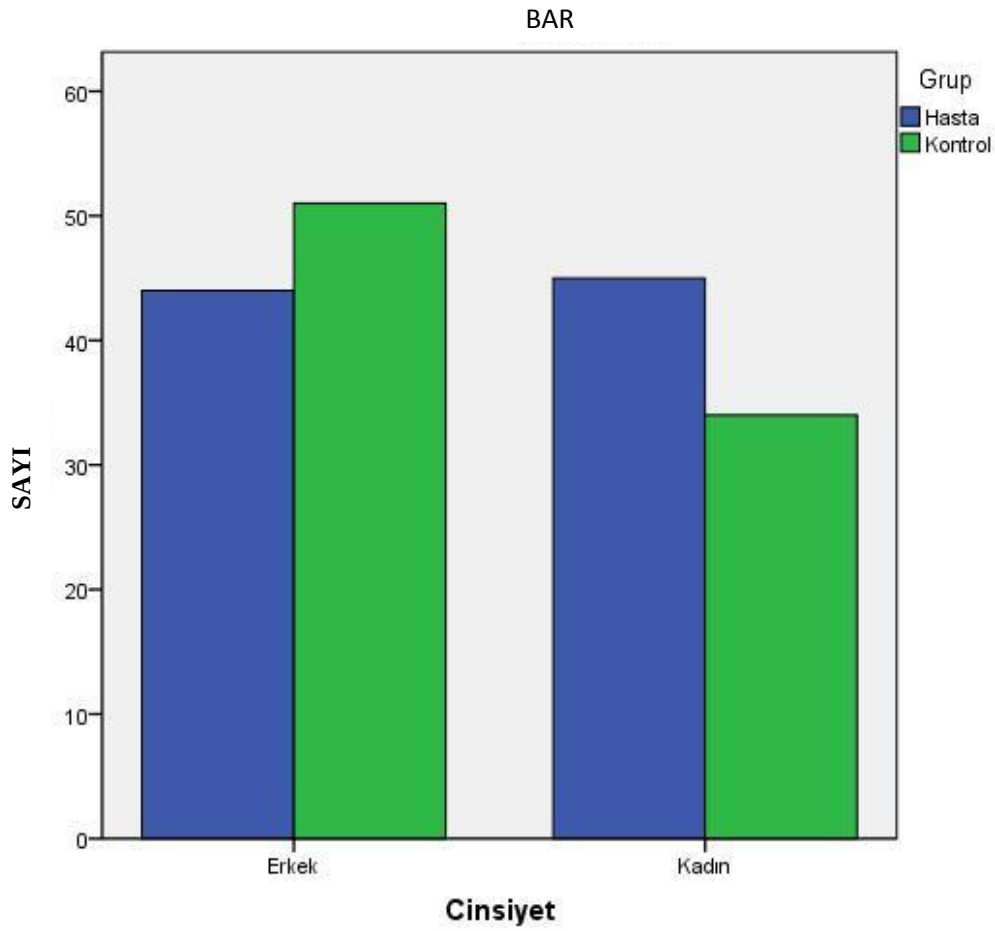
Kesim ürününün değerlendirilmesi için inkübasyondan sonra örnekler agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Örnekler, %2 oranında hazırlanmış olan agaroz jelde 90 voltta 40 dakika kadar (37- 501 bç aralığında) pUC19 MspI kesimi DNA belirleyici eşliğinde yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak UV ışık altında görüntülendi. Elde edilen bantlar incelenerek her bir örneğin genotipi tayin edildi.

3.1.2.7 Sonuçların İstatistikî Yöntemlerle Analizi

İstatistiksel değerdendirmeler için SPSS for Windows 18,0 (Statistical Pack age for Social Sciences) paket programı kullanıldı. Gruplar arası oranların karşılaştırmasında ki-kare testi kullanıldı. Sürekli değışken olan yaş, işitme kaybı süresi(ay) ve konuşmayı alma eşik düzeyleri normal dağılım yönünden Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Gruplararası (gen polimorfizm açısından) sürekli değışkenler karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis test ve Mann-Whitney U test kullanıldı. Tüm istatistiksel veriler için $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

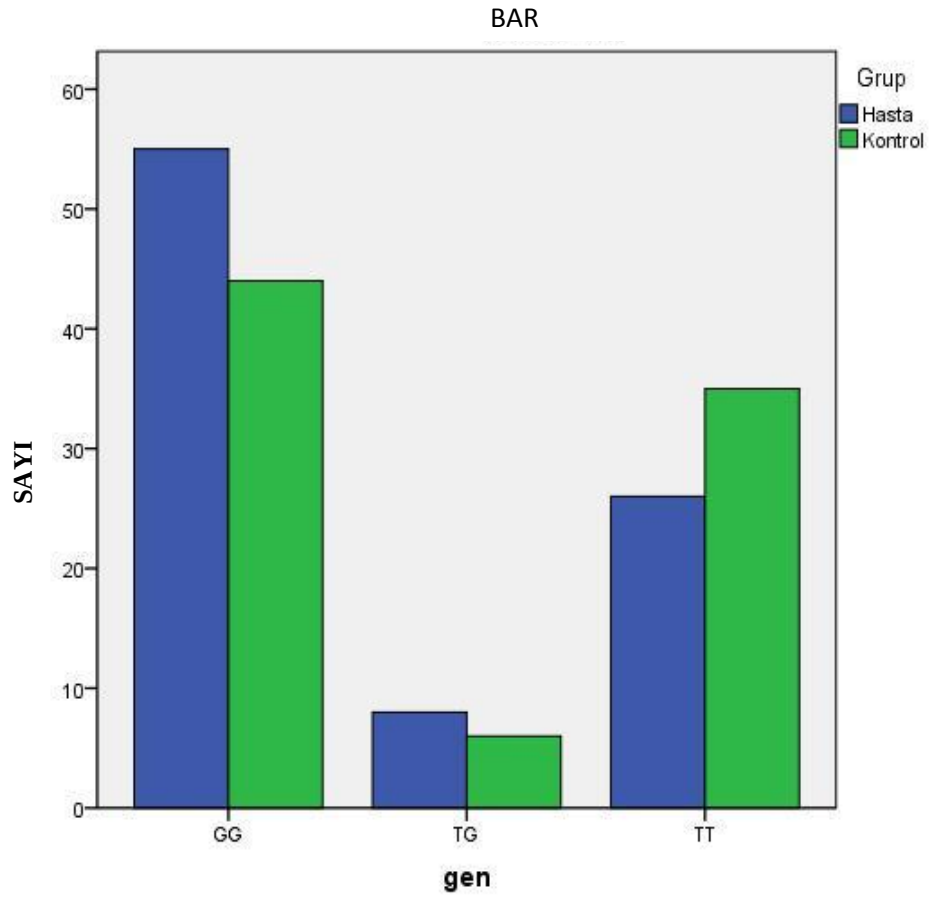
Çalışmaya dahil edilen 89 hastaların 44 ü erkek (%49.5), 45 i bayan (% 50.6) idi. Kontrol grubuna dahil edilen 85 bireyin 51’ i erkek (% 60) 34 ‘ ü bayan (% 40) idi . Her iki grupta cinsiyet yönünden istatistiki olarak benzerdir (p: 0162).



Şekil 1: Grupların cinsiyete göre dağılımı

Hasta grubunun yaş ortancası 7 (min – max; 4-15). Kontrol grubunun yaş ortancası da 7 (min – max; 2-13) olup yaşlarının istatistiksel olarak benzerdir (p:0.094)

Yapılan genetik analiz sonucunda; hasta ve kontrol grubunun eNOS geni Glu298Asp polimorfizmi açısından genotipik dağılımı şekil 2/Tablo 5’de gösterilmiştir. EOM hasta grubu ile sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunun eNOS geni Glu298Asp polimorfizmi araştırılmış olup genotipik dağılım açısından (G/G, G/T, T/T) gruplar arasında fark olmadığı bulundu. Bu gruplar allel dağılımı açısından kıyaslandığında iki grup arasında fark olduğu bulundu (tablo 5) ($p=0,037$). Bu sonuçlar ışığında G alleli taşımanın seröz otit gelişimine yatkınlığa neden olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 2: eNOS geni Glu298Asp polimorfizminin Gruplar arasındaki dağılımı

Tablo 5: Hasta ve kontrol grubunun genetik analiz sonuçları.

Genotypes/ Alleles	Controls (n=85) n (%)	Cases (n=89) n (%)	P	OR (95% CI)
G/G	44(51.8)	55 (61.8)		
G/T	6 (7.1)	8 (8.9)	0.911*	0,93(0.30-2.90)
T/T	35 (41.2)	26 (29.2)	0.112**	0,59(0.31-1.13)
G	94 (55.3)	118 (69.4)		
T	76 (44.7)	60(35.3)	0.037***	1.590 (1.031-2.453)

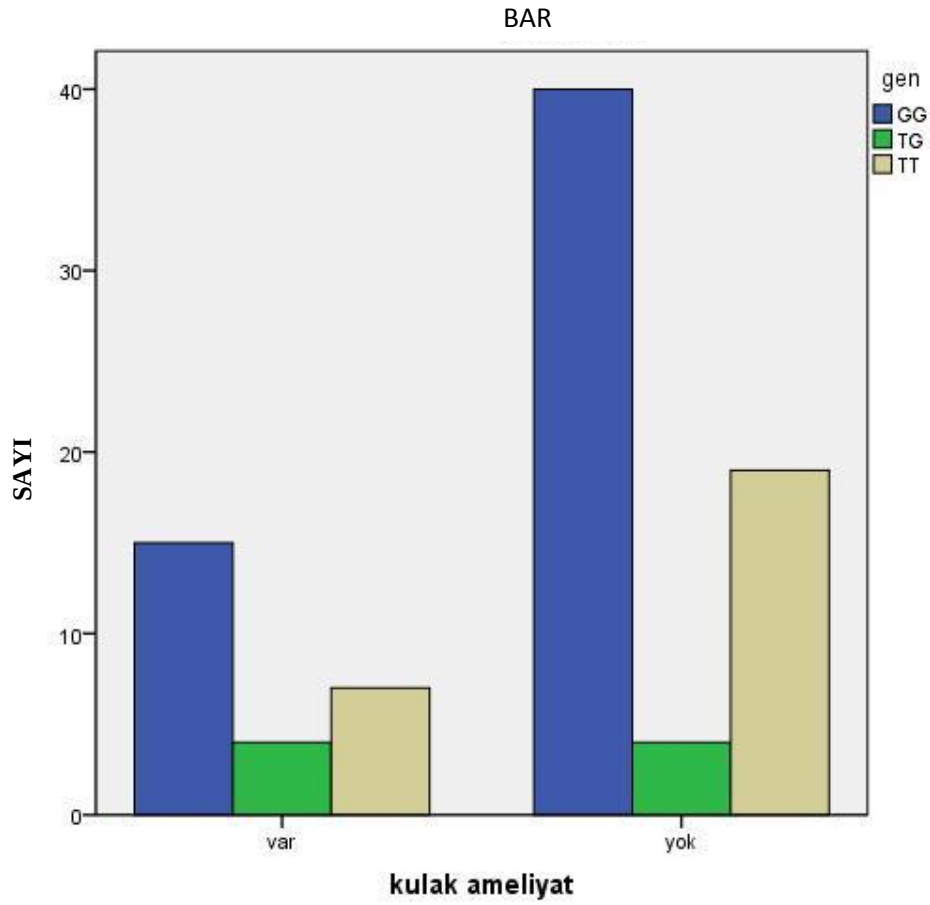
OR, odds ratio; Ki Kare testi, * G/G ve G/T, **G/G ve G/T, *** G ve T

EOM ‘li hastaların klinik özellikleri ile eNOS genotipik dağılımı arasındaki ilişkinin istatistiksel analizinde;

Gen polimorfizmi ile cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir (p: 0.369)

Hastaların 25 inde (%28,1) ailesinde işitme kaybı hikayesi mevcuttu. 64 (%71,9) hastanın ise aile hikayesinde işitme kaybı hikayesi mevcut değildi. Yapılan istatistiksel analizde gen polimorfizmi ile ailede işitme kaybı hikayesi arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p: 0.550)

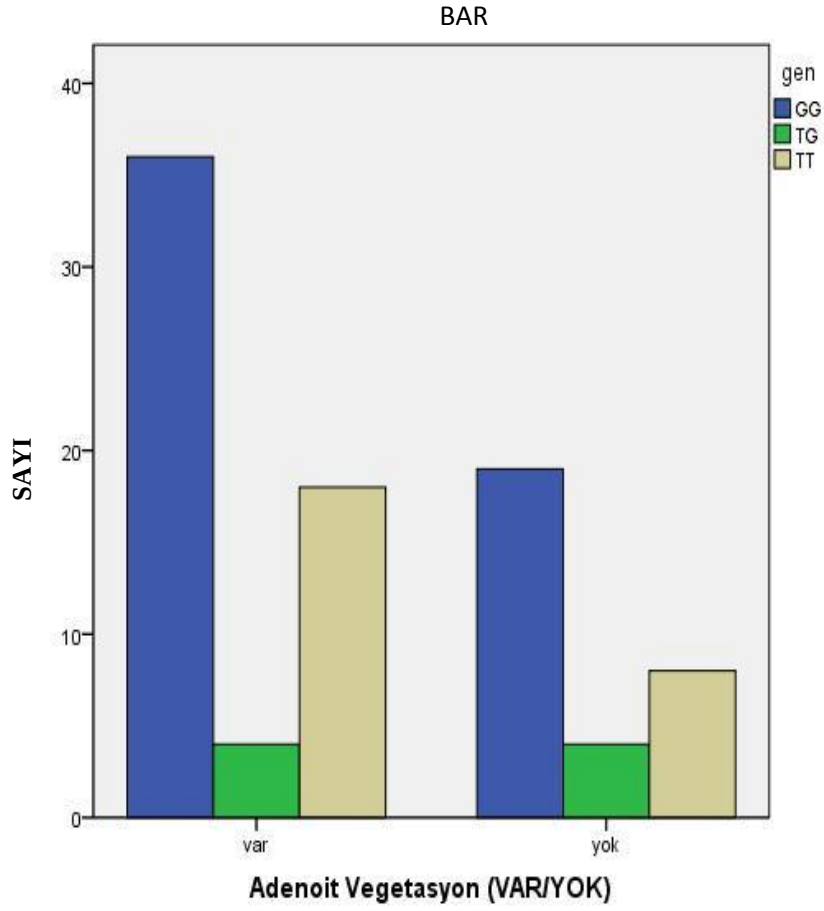
Hastaların 26 (%29,2) tanesinin daha önce ventilasyon tüpü takıldığı 63 (% 70,8) tanesinin daha önce opere olmadığı tespit edilmiş. Yapılan istatistiksel analizde gen polimorfizmi ile operasyon öyküsü arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p:0.390).



Şekil 3: Gen polimorfizmi ile cerrahi öyküsü arasındaki dağılım

Hastaların 16 (% 18) inde alerjik rinit öyküsü bulunmaktadır, 73 hastada (%82) alerjik rinit öyküsü bulunmamaktadır. Yapılan istatiksel analizde gen polimorfizmi ile alerjik rinit arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p:0.805) .

Hastaların 58 (%65,2) inde adenoid vej bulunmaktadır. 31(%34,8) hastada adenoid vej. Rastlanmamıştır. Yapılan istatiksel analizde gen polimorfizmi ile adenoid vej. İle anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (p:0.606).



Şekil 4: Adenoid vej. İle gen polimorfizmi arasındaki ilişki

Çalışmaya katılan hastaların 3 (%3.4) tanesinde sistemik hastalık hikayesi bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizde gen polimorfizmi ile sistemik hastalık hikayesi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (p:0.857)

Hastalardaki işitme kaybı dereceleri sağ kulakta ortalama 20 dB sol kulakta 15 dB idi. Yapılan istatistiksel analizde gen polimorfizmi ile işitme kaybının şiddeti ile anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p:0.989).

Hastalardaki işitme kaybı süresi ortalama 24 aydır. Yapılan istatistiksel analizde gen polimorfizmi ile işitme kaybı süresi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (p:0.432).

5. TARTIŞMA

Effüyonlu otitis media (EOM)akut enfeksiyon bulgu ve belirtisine neden olmadan orta kulak boşluğunda sıvı birikimiyle seyreden orta kulak mukozasının inflamatuvar bir hastalığıdır(36). EOM viral üst solunum yolu enfeksiyonlarından sonra çocukluk çağıının en sık görülen rahatsızlıklarındandır. EOM ayrıca çocukluk yaş grubunda işitme azlığına yol açan en önemli hastalılardan birisidir. Bundan dolayı çocukların iletişim, eğitim, mental ve psikososyal gelişimde önemli yere sahip bir rahatsızlıktır. Hastalığın etiolojisinin ve tedavisinin henüz tam açıklığa kavuşturulamamış olması hastalığın önemini daha da arttırmaktadır (89).

EOM gözden kaçan ve çok sık görülen çocukluk çağı hastalıklarındandır. Yapılan çalışmalarda hasta yaşı EOM en önemli faktör olarak bildirilmiştir. Yaşamın birinci yılında çocukların %50'sinde orta kulak efüzyonu görülmektedir. Ayrıca sekiz yaşına kadar çocukların%75-80'i genellikle bir veya birkaç defa EOM rahatsızlığı geçirir. Okul öncesi çocukların %40'ında hiç olmazsa yılda bir defaEOM geçirdiği bildirilmektedir. İnsidansın en yüksek olduğu yaş aralığı ise 6-24 ay olarak kabul edilmektedir. İnsidansta her ne kadar 5-6 yaş arasında bir yükselme olsa da 7-8yaşlarında tekrar bir düşüş görülmektedir. Bunun da üst solunum yolu enfeksiyonu görülme sıklığıyla paralel olduğu savunulmaktadır (89).

Bizim çalışmamızda yaş ortalaması yedi idi. Cinsiyet bakımından 95 (%54.6) erkek 79 (%45.4) kadındı.

EOM tanısı otoskopik muayene, timpanogram ve odyogram ile konulmaktadır. Odiometrik ölçümlerde görülen, iletim tipi işitme kaybı düşük frekanslarda daha belirgindir. Odyametrik ölçüm sonuçları ortalama 15-30 db seviyelerindedir. Fakat 0-50 db arasında değişebilmektedir(90)

Çalışmamızda anemnez ve otoskopik muayenede EOM'dan şüphelenilen hastalarda timpanogram ve odyometri ile tanı konulmuştur. Çalışmaya dahil edilen hastalarda işitme seviyeleri sağ kulakta 20 dB sol kulakta 15 dB di.

EOM etiyojisi henüz net olarak ortaya konulamamıştır. Fakat etiyojide çeşitli nedenler suçlanmaktadır. Bakteriyel, viral ya da alerjik inflamasyonlar orta kulak mukozasında mukosiliyer aktiviteyi bozarak mukozanın ödemlenmesine ve effüzyon oluşumuna neden olabilmektedir. Adenoid vejetasyonu, nazofarenks tümörleri, yarık damak östaki tüpünün ağzında obstrüksiyona ve drenajın bozulmasına bağlı EOM oluşumuna neden olabilmektedir. Etiyoloji net olarak aydınlatılamamış olsa da östaki tüpünün fonksiyonunda ve/veya orta kulak mukozasında mukosilier aktivitede bozukluğa neden olan birçok patolojinin EOM oluşmasına sebep olduğu bilinmektedir(33).

EOM meydana gelmesinde bazı enflamatuarmediyatörlerin ve enzimlerin etkili olduğu bilinmektedir. Lökotrienler, proteazlar, trombosit aktive edici faktör, histamin, prostaglandinler, kinin, tümör nekrozis faktör ve gamma interferon bunlardan bazılarıdır. Bu mediatörlerin salgılandıklarında, damar geçirgenliğiveorta kulak sekretuar aktivitesinde artışa bunun sonucunda da EOM'ya neden olduğu gösterilmiştir(36). Her ne kadar patofizyojisi net olarak ortaya konamamış olsa da birçok araştırmacı EOMmeydana gelmesinde mikroorganizmalar, endotoksinler, immünkompleksler ve araşidonik asit metabolitleri gibi çeşitli patojenik faktörler etkili olduğunu göstermiştir. Özellikle inflamatuarmediatörler EOM patofizyolojisinde önemli rol almaktadır. Orta kulakta ve EOM sırasında histamin salınımını için koşulların uygun olduğu bilinmektedir. Orta kulak mukozasında mast hücreleri yeterince bulunmaktadır. Mast hücrelerinden degranülasyonotitismedialı hastaların orta kulak mukozasında devam etmektedir. Bu degranülasyona bağlı olarak enflamasyonu tetikleyen histaminmast hücre granülerinden serbest bırakılmakta ve orta mukozasında effüzyon oluşumuna yatkınlık meydana getiren değişikliklere neden olmaktadır (91).

Howie VM ve ark yaptıkları çalışmada 10-18 ay arası hastalarda, IgA seviyesinin hastanın serumuna göre orta kulak sıvısındadaha yüksek konsantrasyonlarda olduğunu bildirmiştir. Orta kulak sıvısındaki yüksek seviyedeki IgA da orta kulak sıvısında izole edilen bakteri sayısında azalmalara neden olmaktadır. Sonuç olarak orta kulak patolojilerin meydana gelmesinde lokal konak savunma elemanlarının da önemli role

sahip olduğunu bildirmiştir (92). Bu sonuçlar gerekiminolojik gerekse de enflamatuarmediatörlere bağlı orta kulak mukozasında meydana gelen lokal değişikliklerin orta kulak patolojilerinde önemli olduğunu düşündürmektedir.

Nitrik oksit (NO) vasküler tonusu, immun sistemin düzenlemek, platelet agregasyonunun inhibe etmek, lökositlerin endotel hücrelerine yapışmaları ve bu hücrelerin enflamasyon olan dokuya göç etmeleri, damar geçirgenliğinin kontrolü, patojen hücrelere ve tümör hücrelerine karşı sitotoksiste, düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve kollajen sentezinin inhibisyonu gibi birçok önemli görevi yerine getirmektedir (64,65). NO salgılanmasını takiben dolaşım sisteminde vazodilatasyona neden olur. Oluşan vazodilatasyon bölgesel ve/veya sistemik kan basıncını düzenlemesi ve kan akımının artırılmasına neden olur(66, 67). NO vasküler ekstrasvazasyonunu, nötrofil göçünü ve müsin hipersekresyonunu artırarak effüzyon gelişimine aracılık eden inflamatuarmediatör olarak EOM patogenizinde rol oynar(93). NO nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından düzenlenmektedir. NOS'unnöronalisiform (nNOS), endothelialisiform (eNOS), ve uyarılabilir isoform (iNOS) olmak üzere üç formu bulunmaktadır. Kohleada her üç NOS izoformunun yaygın olarak dağıtıldığı immünohistokimyasal, histokimyasal ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak gösterilmiştir. Başlarda iç kulaktaki NO üretimindeki değişikliklerin damar homeostazının düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu bilinmekteydi. Daha sonra NO'nun ayırcavestibülafferent liflerin bazal deşarjına ve mekanik uyarıcılara yanıtı katkıda bulunduğu, bağlanabilen N-metil-d-aspartat (NMDA) reseptör aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir (94).

Ayrıca NO radikallerinin kokleada hücre içi ve hücreler arası haberci olarak fonksiyon gördükleri ve oluşan NO radikallerinin miktarına bağlı olarak birçok orta kulak patolojisinde tetikleyici olarak görev yaptığı bildirilmiştir (94) .

Solunum yolu epiteli üzerindeki etkilerinden dolayı NO orta kulak mukozası yanında diğer solunum yolu yapılarını da etkilemektedir. Literatürde NO'nun enflamasyon üzerine etkileri ile ilgili farklı görüşler mevcuttur. Bazı yazarlar NO'nun anti-inflamatuarmediatör bir fonksiyona sahip olduğunu bildirmesine karşılık NO'nun enflamasyona bağlı hücre ve doku işlev bozukluğunu teşvik ettiğini savunanlarda bulunmaktadır. Eun-ju Otitis media (OM) patojenezinde NO'nun önemli bir inflamatuarmediatör olduğunu bildirmiştir. Orta kulakta meydana gelen çeşitli inflamatuarmediatör uyarılar sonrasında orta kulak mukozasında indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) uyarılmakta ve NO sentezlenmektedir.

Sentezlenen NO orta kulakta damar dışına nötrofil göçünü ve müsin salgılanmasını arttırarak OM gelişimini aracılık etmektedir (95). Ayrıca İNOS tarafından aşırı miktarda NO salgılanmasının uyarılmasının silialı solunum yolu epitelini yapısına zarar verdiğini bildirilmiştir (96).

Akut enflamasyon benzeri birçok patolojik olayda NO deriveleri reaktif oksijen radikalleri ile tepkimeye girmektedir. Bu tepkimeler sonucunda peroksinitrit gibi NO-türevi ara maddeleri üretilmektedir. Üretilen peroksinitrit son derece reaktif olduğundan hücre komponentleri ile hemen reaksiyona girer ve reaksiyona girdiği bu hücre komponentlerine ve faaliyetlerine zarar verir. Eun-juJeon ve ark. NO ve peroxinitritin EOM oluşturulan deney hayvanlarında mukosilier aktivite üzerine etkisini araştırmışlar. NO'nun otitis mediada ortaya çıkan patofizyolojik değişikliklere hemen her aşamasında katılan çok önemli bir sinyal molekülü olduğunu bildirmişler. Yazarlar ayrıca NO'ya bağlı orta kulakta ortaya çıkan zararlı etkinin NO ve reaktif oksijen radikalleri arasında meydana gelen reaksiyon sonucunda ortaya çıkan metabolitler yoluyla olabileceğini savunmuşlar (95).

Literatürde EOM ile NO ve NOS arasındaki ilişkiye yönelik gerek hayvan gerekse de insan çalışmaları bulunmaktadır. Bu çalışmalarda NO ve NOS seviyeleri ve aktiviteleri araştırılmıştır. Tezimizde EOM'lı çocuklarda NOS polimorfizmini değerlendirdik. Bu sonuçlar ışığında G alleli taşımanın seröz otit gelişimine yatkınlığa neden olduğu tespit edilmiştir. Bilgilerimize göre literatürde bu konuda bir çalışma bulunmamaktadır.

EOM ve diğer kulak patolojileri ile NO ve/veya NOS arasındaki ilişkiye yönelik literatürde ulaşabildiğimiz hayvan çalışmalarına baktığımızda; Yılmaz A ve ark. EOM oluşturdukları deney hayvanlarında eritrosit nitrik oksit sentaz aktivitesi ve nitrik oksit düzeyleri araştırmışlar. Çalışmanın sonunda NOS ve NO düzeylerinin EOM grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olarak tespit etmişler. Yazarlar NO'nun EOM'da çift ucu keskin bir role sahip olduğunu ve uzun süreli yüksek NO konsantrasyonunun eritrositlerin zarar görmesine neden olabileceğini bildirmiştir (91).

Forséni M. ve ark timpanoskleroz oluşturdukları deney hayvanlarındaki NOS ekspresyonunu değerlendirmişler. Bu çalışmada akut orta kulak iltihabı sırasında iNOS sentezlemesinin uyarıldığı ve buna bağlı sentezlenen NO'nun kulak enfeksiyonlarına karşı konak savunmasında önemli olabileceğini bildirilmiştir. iNOS'un ekspresyonunun orta kulakta akut enfeksiyon varlığında (deneyin 3. Ve 6. günlerinde sakrifiye edilen

ratlarda) daha yüksek seviyelerde iken 10. günde aynı dokularda iNOS' seviyesinin daha az olduğunu 3. ayda ise aynı dokularda bulunmadığı bildirilmiştir. Bundan dolayı yazarlar iNOS ekspresyonunun zamansal olarak sunulduğunu ve bununda akut otitis mediada NO'nun inflamasyonu inhibe edici özelliğini ortaya koyduğunu bildirmiştir (97).

Diao M ve ark ise yaptıkları deneysel çalışmada gürültüye bağlı koklear hasar oluşturdıkları farelerde NOS inhibitörlerinin etkilerini araştırmışlar. Koklear NOS düzeylerinin gürültüye maruz kalan hayvanlarda önemli ölçüde arttığı ve buna bağlı olarak NOS'un aktivasyonunun elde edilen NO'nun da arttığını bildirmiştir. Çalışmada seviyesi artmış olarak tespit edilen NO düzeyinin yüksekliğinin iç kulak fonksiyonlarında bozukluğuna yol açabileceği vurgulanmıştır. Çalışmada kullanılan NOS inhibitörünün NOS seviyesinde meydana getirdiği azalmanın da kobaylarda gürültüye bağlı koklear hasarını azalttığını bildirmiştir. NO küçük miktarlarda damar tonusu ve sinir iletimini düzenlemede etkili iken aşırı NO farklı mekanizmalarla hücreler üzerinde toksik etki gösterebilmektedir. Çalışmada NO'nun dokulardaki toksik etkisini büyük ölçüde serbest oksijen radikalleri ile etkileşimi sonrasında ortaya çıkan peroksinitrit vasıtasıyla oluşturduğu bildirilmiştir. Buda bize yüksek oranlardaki NO'nun yalnız enflamasyon aracılığıyla değil hücreye direkt toksik etki ile zara verebileceğini göstermektedir.

Jung TT ve ark. ise silyaların koklear dış saçlı hücre kültürlerinde NO'nun etkisini araştırmışlar. Çalışmada NO'ya maruz kalan hücre kültürlerinde koklear dış tüylü hücrelerde istatistiki olarak anlamlı derecede etkilenme meydana geldiğini göstermişler. Yazarlar bu sonuçlar ışığında NO'nun kronik otit sekellerinden olan sensörinöral işitme kaybı patogenezinde rolü olabileceğini bildirmişlerdir (98).

Granath Ave ark. Adenoid vegetasyonu ile birlikte EOM olan ve olmayan çocuklarla iNOS, eNOS, IL-1b and TNF-a ekspresyon düzeylerini araştırmışlar. Çalışma sonunda kontrollere göre adenoid vegetasyonu ile birlikte EOM olan hastalarda iNOS ekspresyonunun düşük seviyede olduğunu tespit etmişler. Böyle bir fark eNOS'da tespit edilmemiş. Ayrıca iNOS da görülen bu düşük seviyenin sitokin düzeylerindeki değişiklikler ile ilişkili olmadığı bildirilmiş. Çalışma sonucunun adenoidvegetasyonu ile birlikte EOM olan çocuklarda iNOS ekspresyonunun düşük elde edilmesinin EOM gelişimine karşı NO'nun koruyucu rol oynadığı yönünde yorumlanabileceğini bildirmiştir. Ayrıca EOM'lı çocuklarda lokal olarak antiinflamatuvar etkisinden dolayı

artmış NO miktarının çocuğun mikrobik enfeksiyonlara karşı yanıt verme yeteneğinde azalmaya neden olacağını savunmuştur (99).

Aktan B ve ark EOM'da enflamatuvar uyarıya cevap olarak orta kulak mukozasının yoğun hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını uğradığını ve orta kulağın hızla lökositler tarafından doldurulduğunu bildirmiş. Bu cevapların meydana gelmesine bir dizi biyoaktif molekül aracılık etmektedir. Sonuçta da orta kulak mukozasında ve vasküleritesinde oluşan değişiklikler efüzyon oluşumuna neden olmaktadır. Enflamatuvar yanıtta son zamanlarda NO'nun çok dikkat çekilen bir madde olduğunu ifade edilmiştir. Bundan dolayı çalışmada makrolid grubu antibiyotik verilerek EOM oluşturulan ratlarda NOS, malondialdehyde ve Xanthineoxidase aktivitesi araştırılmış. Çalışmanın sonunda makrolidlerle tedavi edilen grupta deneysel olarak EOM oluşturulan gruba kıyasla Artmış NOS, azalmış malondialdehyde ve Xanthineoxidase aktivitesi tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Yüksek olan NOS aktivitesinin NO sentezini arttırdığı ve NO'nun patojenlere karşı sitostatik-sitotoksik savunma mekanizmalarıyla spesifik olmayan bağışıklık cevap olarak davrandığı kanaatine varılmış. Sunulan çalışmada NO'nun orta kulakta enflamasyonun giderilmesinde olumlu katkı sağladığını sonucuna varılmış (100).

LiuHY ve ark yaptıkları deneysel çalışmada deney hayvanlarında aminoglikozit toksisitesi meydana getirmiş ve bu toksisiteye iNOS inhibitörü ajanların etkinliğini araştırmışlar. Çalışma sonunda iNOS aktivitesinin ve buna bağlı olarak NO sentezinin azaldığı ve oluşan ototoksisiteye karşı iNOS inhibitörünün olumlu etki gösterdiği bildirilmiştir (101).

Hisamatsu K ve ark. nitrotirosin'in orta kulak mukozasında meydana getirdiği değişiklikleri orta kulak sıvılarının inceleyerek araştırmışlar. Nitrotirozin NO süperoksit ile reaksiyona girdiğinde üretilen peroksinitrit atakları ile oluşturulan NO-Süperoksit sistem aktivitesini gösteren parametrelerdendir. Normalde bu sistem konak savunmasında fizyolojik olarak rol almaktadır. Fakat aşırı NO varlığında zararlı etkiler ortaya çıkarmaktadır. Çalışmanın sonucunda yazarlar EOM etiopatogenezinde NO-süperoksit sisteminin önemli bir yere sahip olduğunu ve bu sistemde meydana gelen patolojilerin orta kulakta protein ve / veya hücre hasarı belirtilerine neden olduğunu bildirmiştir (102).

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada, seröz otitli çocuklarda eNOS gen polimorfizmi değerlendirildi. Bu hastaların genetik sonuçları; cinsiyet, yaş, cerrahi hikaye, medikal tedavi süresine ve sistemik hastalık varlığına göre karşılaştırıldı. Bu sonuçlar ışığında G alleli taşımanın seröz otit gelişimine yatkınlığa neden olduğu tespit edilmiştir. Diğer parametrelerin genetik polimorfizmle bağlantılı olmadığı tespit edildi.

7.KAYNAKLAR

1. Bluestone CD , Gates GA ,Klein JO , et al. Recent advances in otitis media. Panel reports .Definitions, 22terminology and classification of otitis media. Ann Otol Rhinol Laryngol 2002;111:8-18.
2. Williamson I. Otitis media with effusion . Clin Evid 2002;7:469-76.
3. Casselbrant ML, Brostoff LM, Flaherty MR, et al. Otitis media with effusion in preschoolchildren. Laryngoscope 2000; 95: 428-436.
4. Belmont M.J. Myringotomy and Tympanocentesis. Ed: Alper C, Bluestone CD. Advanced Therapy of Otitis Media. BC Decker Inc. London 2004. pp: 58-61.
5. Rosenfeld MR, Culpepper L, Doyle KJ, Grundfast KM et al. Clinical practice guideline: Otitis media with effusion Otolaryngology-Head and neck surgery. May 2004; 130: 95-115.
6. Kemaloglu YK. Orta Kulak Effuzyonlari. J Surg Med Sci 2005;1 (7): 41-9.
7. Rhee CK. Candidate's thesis: Platelet-activating factor-induced hearing loss: mediated by nitric oxide? Laryngoscope. 2003 Dec;113(12):2059-66.
8. Rhee CK. Candidate's thesis: Platelet-activating factor-induced hearing loss: mediated by nitric oxide? Laryngoscope. 2003 Dec;113(12):2059-66.
9. Rose AS, Prazma MJ, Randell SH, et al. Nitric oxide mediates secretion in endotoxin-induced otitis media with effusion. Otolaryngol Head Neck Surg 1997;116:308-16.

10. Paparella MM, Brady DR, Hoel R. Sensorineural hearing loss in chronic otitis media and mastoiditis. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1970;74:108-15.
11. Amaee FR, Comis SD, Osborne MP, et al. Possible involvement of nitric oxide in the sensorineural hearing loss of bacterial meningitis. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997;117:329-36.
12. Akyıldız N. İç Kulak Anatomisi. Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. 1998; 1.cilt: 49-61.
13. Austin DF. Anatomy of The Ear. In: Ballenger J. Diseases of the Nose, Throat, Ear, Head and Neck. 14ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1991. p. 922 -47.
14. Gulya AJ. Anatomy of the temporal bone. Shambaugh GE Jr, Glasscock ME III, editors Surgery of the ear. Ed 5 Philadelphia: WB Saunders; 2003 35 -49.
15. Cummings CW, Harker LA, Krause CJ, Richardson MA, Schuller DE. Otolaryngology, head and neck surgery. Mosby, New York. 1998; 3263 –64.
16. Gulya AJ, Schucknecht HF. Anatomy of temporal bone with surgical implications. 2nd ed. Pearl River (NY): Parthenon Publishing Group, Inc. ; 1995.p. 20-45
17. Pabuçu Y. Bilgisayarlı Tomografi. 23. Ulusal Radyoloji kongresi, Nürol Matbaacılık A. Ankara, 2002: 52 -73.
18. Gulya AJ, Schucknecht HF. Anatomy of temporal bone with surgical implications. 2nd ed. Pearl River (NY): Parthenon Publishing Group, Inc ; 1995.p.30-45.
19. Duckart LG. Anatomy of the skull base, temporal bone, external ear and middle ear. In: Cummings CW, Fredrickson JM, Krause CJ, Richardson MA, Harker LA,

- Schüller DE eds. Otolaryngology Head and Neck Surgery. St. Louis: Mosby-Year Book, 1998: 2533 -46.
20. Gulya AJ. Anatomy of the temporal bone. Shambaugh GE Jr, Glasscock ME III, editors Surgery of the ear. Ed 5 Philadelphia: WB Saunders; 2003 35 -49.
 21. Akyıldız AN. Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi I. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2002: 77 -99.
 22. Pearson AA. Development of anatomy of the ear. In: English GM, editor. Otolaryngology. Philadelphia: Harper and Row Publishers; 1984. 1 -68.
 23. Austin DF. Anatomy of The Ear. In: Ballenger J. Diseases of the Nose, Throat, Ear, Head and Neck. 14ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1991. p. 922 -47.
 24. Donaldson JA, Duckert LG. Anatomy of the ear. In: Paparella MM, Shumrick DA, Gluckman JL, Meyerhoff WZ, eds. Otolaryngology. Philadelphia: Saunders, 1991: 23-58.
 25. Dew LA, Shelton C. Complications of temporal bone infection. In: Cummings CW, Fredericson JM, Harker LA et al, eds. Otolaryngol Head and Neck Surgery, 3rd ed. St Louis: Mosby Year Book; 1998. p. 3047 -73.
 26. Akyıldız AN. Kulak hastalıkları ve mikroirürüjisi. Cilt I, Ankara: Ongün Kardeler Matbaacılık, 1986:1 -33, 52, 65, 89-104, 118-126, 313-34.
 27. Williams L, Warwick R, Dyson M, Banister LH: Grays Anatomy. Churchill Livingstone, Edinburg 1989, pp 172, 1226 -8.
 28. Swartz JD, Harnsberger RH. Imaging of the Temporal Bone, 3th edition. New York, Thieme Medical Publishers Inc. ,1998:47 -107.

29. Staubesand J. Sobotta nsan Anatomisi Atlası. 1.Cilt, Münih, Beta Basım Yayıtım Dairtım A,2001:384 -95.
30. Dew LA, Shelton C. Complications of temporal bone infections. In: Cummings CW, Fredrickson JM, Harker LA, et al, eds. Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 3rd ed. St. Louis: Mosby; 1998; 3047-75.
31. Gates GA, Klein JO, Lim DJ, Mogi G, Ogra PL, Pararella MM et al. Recent advances in otitis media. 1. Definitions, terminology, and classification of otitis media. Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl. 2002;188:8-18.
32. Handler SD, Magardino TM. Otitis Media with Effusion. In; Canalis RF. Lambert PR, eds. The Ear Comprehensive Otology. Chapter 23, Lippincot Williams & wilkins. Philedelphia/USA. 2000;383-96.
33. Iwano T, Kinoshita T, Hamada E, et al. Otitis media with effusion and eustachian tube dysfunction in adults and children. Acta Otolaryngol 1993; 500:66–9.
34. Kemaloğlu YK. Orta kulak efüzyonları. Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci 2005,1(17) 41-49.
35. Kemaloğlu YK, Özbilen S. Efüzyonlu Otitis Media. Kulak Burun Boğaz Baş Boyun Cerrahisi'nde güncel yaklaşım (Pediatrik otolaringoloji). 2006; 2:27-37.
36. Hızalan M.I. Efüzyonlu Otitis Media. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi. Onur Çelik. Turgut Yayıncılık, İstanbul. 2002; 116-42.
37. Fireman P. Otitis media and nasal disease: a role for allergy. J Allergy Clin Immunol. 1988; 82: 917-26.
38. Akyıldız N. Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi. Ankara. Bilimsel Tıp Yayınevi.1998 .p.22-90

39. Doyle WJ, Alper CM, Bluestone CD, et al. Middle ear physiology and pathophysiology. In: Lim DJ, Ed. Recent advances in otitis media. *Annals Otol Rhinol Laryngol* 1998; 107:14–20.
40. Officiers FE, Somers T. Gas Exchange in the middle ear: tuba or mucosa? In Sade J, ed. *Infections In Childhood*, Elsevier 1994:2–6.
41. Healy GB. Otitis media and middle ear effusions. In: Ballanger JJ, Snow JB, eds. *Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, (ed15). London: Williams & Wilkins. 1996;1003-9.
42. Akyıldız N, Kemaloğlu YK. Çocukluk Çağı KBB Hastalıkları – 1. Otitis Media. *Ankara Bilimsel Tıp Yayınevi*. 1998. p.80-5
43. Karlidag T, Bulut Y, Keles E, Kaygusuz I, Yalcin S, Ozdarendeli A, Dabak H. Detection of *Helicobacter pylori* in children with otitis media with effusion: a preliminary report. *Laryngoscope*. 2005; 115:1262-5.
44. Van auwenberge, Watelet JB, Dhooge I. Uncommon and unusual complications of otitis media with effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1999; KSuppl 49 S119-25.
45. Lesinskas E, Kasinskas R: Prognostic factors of results of conservative treatment of secretory otitis media for adults. *International Congress Series*. 2003; 1240: 101-3.
46. Segal N, Leibovitz E, Dağın R, Leibermen A. Acute otitis media-diagnosis and treatment in the era of antibiotic resistant organisms: updated clinical practice guidelines. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2005; 69:1311-9.

47. Kiliç R, Safak MA, Ozdek A, Göçmen H, Kiliç D, Samim E. Effect of 23 valent pneumococcal polysaccharide and Haemophilus influenza conjugated vaccines on the clinical course of otitis media with effusion. *Laryngoscope*. 2002; 112:2042-5.
48. Bluestone CD: Pathogenesis of otitis media: role of eustachian tube. *Pediatr Infect Dis J*. 1996; 15:281-91.
49. Karlıdag T, Demirdag K, Kaygusuz I, Ozden M, Yalçın S, Oztürk L. Resistant bacteria in the adenoid tissues of children with otitis media with effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2002; 64:35-40.
50. Poetker DM, Lindstrom DR, Edmiston CE, Krepel CJ, Link TR, Kerschner JE. Microbiology of middle ear effusions from 292 patients undergoing tympanostomy tube placement for middle ear disease. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2005; 69: 799- 804.
51. Koç C. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Ve Baş-Boyun Cerrahisi. 2004; 153-68.
52. Ono T, Yoshida Y, Izumaru S, Nakashima T. A case of nasopharyngeal actinomycosis leading to otitis media with effusion. *Auris Nasus Larynx*. 2006; 33: 451- 4.
53. Ovesen T, Felding JU, Tommerup B, Schousboe LP, Petersen CG. Effect of N-acetylcysteine on the incidence of recurrence of otitis media with effusion and re-insertion of ventilation tubes. *Acta Otolaryngol Suppl*. 2000; 543:79-81.
54. Önerci M. Effüzyonlu otitis media. In Kulak Burun Boğaz Baş Boyun Cerrahisi Hastalıkları. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Basımevi, 2007, pp 440-3.
55. Doyle K, Kong YY, Strobel K, Dallaire P, Ray RM. Neonatal middle ear effusion predicts chronic otitis media with effusion. *Otol Neurotol*. 2004; 25:318-32.

56. Akyıldız N, Kemaloğlu YK. Çocukluk Çağı KBB Hastalıkları–I. Otitis Media. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2000.p.80-90.
57. Öktem F. Efüzyonlu otitis media ve lazer miringotomi. İstanbul, Kansa Matbaacılık, 2005.p. 97-100.
58. Kemaloğlu YK. 2000’li yıllara girerken akut otitis media. Enfeksiyon Gündemi. 2000; 1:51-72.
59. Özgirgin ON. Mastoidectomy in chronic otitis media with effusion. In: Alper CM, Bluestone CD, Casselbrant ML, Dohar JE, Mande EM eds: Advanced therapy of otitis media, Ontario, BC Decker Inc. 2004;218- 23.
60. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA1987; 84: 9265-9.
61. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 1988; 333: 664-6.
62. Asuman KILINÇ, Kamer KILINÇ : Nitrik Oksit ; Biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. Palme Yayıncılık 1. baskı 2003:120-9.
63. Gruetter C.A., Barry B.K., McNamara d.B.: Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosamine . J.Cyclic Nucleotide res. 1979; 5: 211-44.
64. Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S.: Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. Lancet 1987;2:1057-8.

65. Garg U.C., Hassid A.: Nitric oxide-generating vasodilators and 8- bromocyclic guanosine monophosphate inhibits mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells.J.Clin.Invest.1989;83: 1774-7.
66. Dusting G.J.,: Nitric oxide in coronary artery disease, roles in atherosclerosis, myocardial infarction and heart failure. EXS 1996; 76: 33-5.
67. Dusting G.J.,: Nitric oxide in cardiovascular disorders. J. Vasc. Res. 1995; May-June: 32(3) :141-3.
68. Nathan C., Xie Q.W.: Nitric oxide synthases. Roles, tolls and controls.Cell 1994;78: 915-8.
69. Bivalacqua T.J., Champion H.C., Hellstrom W.J.G.: Implications of nitric oxide synthases isoforms in the pathophysiology of peyronie's disease.Int. J. Imp.Res 2002;14:345-52.
70. Albecht E., Stagemen C., Heeringa P., Henning R.H., Van Goor H.: Protective role of endotelial nitric oxide synthase.J.Pathol.2003; 199:8-17.
71. Hua Wan, Yu Amy. Nitric oxide synthase in motor neurons after axotomy. The J Histochem and cytochem 1994; 42(4): 451-7.
72. Durate ID, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Peripheral analgesia and activation of NO-cGMP pathway. Eur J Pharmacol 1991; 206: 163-4.
73. Katayama Y. Nitric oxide:Mysterious messenger. Dojindo News Letter 1995; 1:1-20.
74. Olesen J, Thomsen LL, Iversen H. Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. Trend Pharmacol Sci Engl 1994; 15(5): 149-53.

75. Haefliger IO, Flammer J, Luscher TF. Nitric oxide and endothelium are important regulators of human ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33(7):2340-8.
76. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: Synthesis, localisation and function. *Am. J Kidn Dis.* 1994; 24 (1): 112-29.
77. Stark ME, Szurszewski JH. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic dysfunction disease. *Gastroenterology* 1992; 103: 1928-49.
78. Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K. Inhaled nitric oxide for adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993; 328: 399-402.
79. Burnett AL, Lowenstein CJ, Brecht DS. Nitric oxide a physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992; 257: 401- 3.
80. Hegesh E, Sniloah J. Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. *Clin Chim Acta* 1982; 125: 107-15.
81. Richard K. Nitric oxide synthases. *The Biochemist* . Nov.1994; 16(5): 3-6.
82. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The J. Biol. Chem.* 1993; 268 (17): 12231-4.
83. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994; 298: 249-58.
84. Bossenge E. Coronary vasomotor responses: role of endothelium and nitrovasodilators. *Cardiovasc Drug Ther (USA)* 1994; 8(4): 601-10.

85. Drexler H, Zeiher AM, Meinzerk H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolemic human. *J Clin Invest* 1992; 90: 1248-53.
86. Muuruganandam A, Mutus B. Isolation of nitric oxide synthase from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165: 802-9.
87. Salvemini D, Denucci G, Gryglewski RJ. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6328-32.
88. Usmar VD, Radomski M. Free radicals in the vasculature: The good, the bad and the ugly. *The Biochemist* 1994; 16(5): 15-22.
89. Falk B, Magnuson B: Eustachian tube closing failure: Occurrence in patients with cleft palate and middle ear disease *Arch. Otolaryngol.* 1984. 110: 10-4.
90. Googhill V: Ear disease deafness and dizziness. Harper –Row Publishers 1979. 307-29.
91. Adnan Yilmaz, Celil Uslu and Mehmet Akyuz. Nitric oxide synthase activity and nitric oxide level in erythrocytes of guinea pigs with experimental otitis media with effusion *Cell biochemistry and function.* 2006; 24(5): 471-3.
92. Howie VM, Ploussard JH, Sloyer JL, Johnston RB Jr. Immunoglobulins of the middle ear fluid in acute otitis media: relationship to serum immunoglobulin concentrations and bacterial cultures. *Infect Immun.* 1973 Apr;7(4):589-93.
93. Ken-ichi Hisamatsu, MD; Hajime Inoue, PhD; Kiyoshi Makiyama, MD; Masami Hotnma, PhD Nitrotyrosine in Otitis Media With Effusion. 2005 Oct;114(10):804-8.

94. Heinrich, OxanaSelivanova, RalphFeltens, JuergenBrieger, Wolf Mann.
Endothelial nitric oxide synthase upregulation in the guinea pig organ of Corti after acute noise trauma Ulf-RU 2005 Jun 14;1047(1):85-96.
95. JuJeon MD, Yong-Soo Park, MD, SeungKyun Lee, MD,Sang-WonYeo, MD, ShiNae Park, MD, and Ki-Hong Chang, MD. Effect of Nitric Oxide and Peroxynitrite on Mucociliary Transport Function of Experimental Otitis Media. 2006 Jan;134(1):126-31.
96. Ueda T, Takumida M, Takeno S, et al. Functional role of nitricoxidein the nasal mucosa of the guinea pig after instillation with lipopolysaccharide.Acta Otolaryngol 2001;121:510–6.
97. M. Forse G. K. Hansson², D. Bagger and M. Hultcrantz. An Immuno histochemical Study of Inducible NitricOxide Synthase in theRat MiddleEar, with Reference to Tympanosclerosis Acta Otolaryngol 1999; 119(5):577-82.
98. Jung TT, Llaurado RJ, Nam BH, Park SK, Kim PD, John EO. Effects of nitricoxide on morphology of isolated cochlea router haircells: possible involvement in sensorineural hearingloss.OtolNeurotol. 2003 Jul;24(4):682-5.
99. Granath A, Norrby-Teglund A, Uddman R, Cardell LO.Reduced iNOS expression in adenoids from children with otitis media with effusion.Pediatr Allergy Immunol. 2010 Dec;21(8):1151-6.
100. Aktan B, Taysi S, Gümüştekin K, Uçüncü H, Memişoğullari R, Save K, Bakan N. Effect of macrolideantibiotics on nitricoxidesynthaseandxanthineoxidaseactivities, andmalondialdehydelevel in erythrocyte of the guinea pigs with experimental otitis media with effusion .Pol J Pharmacol. 2003 Nov-Dec;55(6):1105-10.

101. Liu HY, Chi FL, Gao WY. Taurine l-lysine ototoxicity by inhibiting inducible nitric oxide synthase expression in the cochlea. *Neuroreport*. 2008 Jan 8;19(1):117-20.
102. Hisamatsu K, Inoue H, Makiyama K, Homma M. Nitrotyrosine in otitis media with effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005 Oct;114(10):804-8.

8. ÖZGEÇMİŞ

06.01.1986 tarihinde Hatay ilinde doğdum. İlkokulu İnönü İlköğretim ilkokulu'nda, ortaokulu Ortaokul ve liseyi Hataya Osman Ötken Anadolu lisesinde Hatay ilinde okudum. 2003 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesine girdim. 2009 yılında mezun oldum. Hatay ın Altınözü ilçesi merkez sağlık ocağında pratisyen doktor olarak göreve başladım. 2010 Nisan TUS sınavını kazanarak 12.01.2010'da Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım.01.09.2012 yılında evlendim. Halen aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.