

DENEYSSEL ÇALIŞMA

Topikal uygulanan askorbik asidin sıçan kulak zarı perforasyonlarında iyileşmeye etkisi

The effect of topical ascorbic acid application on the healing of rat tympanic membrane perforations

Dr. Özgür YİĞİT,¹ Dr. Uğur ÇINAR,¹ Dr. Berna USLU-COŞKUN,¹ Dr. Tülay BAŞAK,² Dr. Seyhan ALKAN,¹
Dr. Özlem ÜNSAL,¹ Dr. Gökhan AKGÜL,¹ Dr. Burhan DADAŞ¹

Amaç: Sıçan kulak zarında oluşturulan perforasyonlarda topikal uygulanan askorbik asidin kulak zarının kapanma süresi ve iyileşmesine etkisi araştırıldı.

Çalışma Planı ve Yöntemler: Deneysel olarak oluşturulan termal miringotomi sonrasında 22 sıçanın sağ kulak zarına topikal askorbik asit, sol kulak zarına ise serum fizyolojik uygulandı. İşlem 48 saat sonra tekrarlandı. Sıçanların ameliyat mikroskobu ile günlük otoskopik muayeneleri yapıldı ve perforasyonların kapanma süreleri belirlendi. Kulak zarlarının her ikisi de kapanmamış olan birer sıçanın yaşamı 5, 7, 10 ve 12. günlerde sonlandırıldı ve iyileşme histopatolojik olarak değerlendirildi. Veriler Student t-testi ile yorumlandı.

Bulgular: Askorbik asit grubunda kulak zarlarının ortalama kapanma süresi 7.6 gün, serum fizyolojik grubunda 8.3 gün bulundu. İki grup arasında kulak zarlarının kapanma süreleri ve histopatolojik iyileşme ölçütleri açısından anlamlı farklılık bulunmadı.

Sonuç: Topikal olarak uygulanan askorbik asidin sıçan kulak zarındaki perforasyonun iyileşmesi üzerine etkili olmadığı sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Uygulama, topikal; askorbik asit/terapötik kullanım; sıçan; timpanik membran/patoloji/ilâç etkisi; timpanik membran perforasyonu/patoloji/ilâç etkisi; yara iyileşmesi/ilâç etkisi.

Objectives: We investigated the effect of topical administration of ascorbic acid on the healing process of tympanic membrane perforations in rats.

Design and Methods: Thermal myringotomy was induced in both ears of 22 albino rats. The right and left ears were assigned to topical applications of ascorbic acid and saline solution, respectively. The same procedure was performed after 48 hours. Perforations were examined daily by otomicroscopy and healing periods were determined. For histopathologic examination, a single rat in which closure of the tympanic membranes was not completed was sacrificed on days 5, 7, 10, and 12. Data were analyzed with the use of the Student's t-test.

Results: The mean durations of healing in the right and left ears were 7.6 and 8.3 days, respectively. No significant differences were found between the applications of ascorbic acid and saline solution with regard to the duration of closure and histopathologic healing criteria.

Conclusion: Our data suggest that topical application of ascorbic acid have no beneficial effect on the healing of rat tympanic membrane perforations.

Key Words: Administration, topical; ascorbic acid/therapeutic use; rats; tympanic membrane/pathology/drug effects; tympanic membrane perforation/pathology/drug effects; wound healing/drug effects.

◆ Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2. KBB Hastalıkları Kliniği, ²Patoloji Kliniği, İstanbul.
◆ Dergiye geliş tarihi: 20 Şubat 2003. Düzeltme isteği: 6 Mayıs 2003. Yayın için kabul tarihi: 19 Mayıs 2003.
◆ İletişim adresi: Dr. Uğur Çınar, Körkadı Sok. Turizm Sitesi, 4. Blok, No: 13, 80600 Ulus, İstanbul.
Tel: 0212 - 263 18 78 Faks: 0212 - 266 11 27
e-posta: u_cinar@yahoo.com

◆ Departments of Otolaryngology, and Pathology, Şişli Etfal Training Hospital, İstanbul, Turkey.
◆ Received: February 20, 2003. Request for revision: May 6, 2003. Accepted for publication: May 19, 2003.
◆ Correspondence: Dr. Uğur Çınar, Körkadı Sok. Turizm Sitesi, 4. Blok, No: 13, 80600 Ulus, İstanbul, Turkey.
Tel: +90 212 - 263 18 78 Fax: +90 212 - 266 11 27
e-mail: u_cinar@yahoo.com

Kulak zarı perforasyonları akut veya kronik süpüratif otitis medianın, ventilasyon tüpü veya kulağa travmaların sekeli olarak gelişebilir. Çoğu zaman akut süpüratif otitis mediada ve travmatik perforasyonlarda kulak zarı kendiliğinden iyileşmekle birlikte, perforasyon bazen kalıcı olabilmektedir. Perforasyon boyutları küçük olsa bile bunların kapatılması için çoğu zaman büyük cerrahi işlemler gerekir. Bu nedenle, kulak zarında cerrahi olmayan kapatma yöntemleri ilgi çeken bir konudur. Kulak zarındaki küçük perforasyonların kapatılmasında topikal uygulanan fibroblast büyüme faktörü, mitomisin C, epidermal büyüme faktörü ve hyaluranik asit kullanımı bildirilmiştir.^[1,2]

Askorbik asit, keratositlerden tip I-tip III kollajen sentezini in vitro olarak artırmaktadır.^[3] Bu özelliğinden dolayı yara iyileşmesinin çeşitli basamaklarına etki edebilmektedir. Kornea, cilt, kolon ve gingivada yara iyileşmesi üzerine olumlu etkilerini gösteren çalışmalar vardır.^[3-6] Askorbik asidin kulak zarında uygulanmasını inceleyen tek çalışmada, sıçan kulak zarına topikal uygulamanın miringoskleroz gelişimi üzerine olan etkisi incelenmiş ve askorbik asidin miringoskleroz gelişimini azalttığı gösterilmiştir.^[7]

Bu çalışmada, sıçan kulak zarında deneysel olarak oluşturulan perforasyon üzerine topikal askorbik asit uygulamasının perforasyonun kapanma süresine ve iyileşme dokusuna olan etkisi araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, Mart-Mayıs 2002 tarihlerinde, ağırlıkları 250-350 gr, dış kulak yolları ve kulak zarları sağlam 22 adet dişi albino sıçan kullanıldı. Çalışma sırasında Helsinki Nihai Senedi'nde deneysel çalışmalarla ilgili koşulların tümüne uyuldu.

Sıçanlara genel anestezi amacıyla 90 mg/kg keta-min ve 10 mg/kg xylazin intramusküler olarak uygulandı. Sıçanlar uyutulduktan sonra karın üzeri yatırıldı ve ameliyat mikroskobu ve spekulum kullanılarak kulak zarları açığa çıkarıldı. Her iki kulak zarında pars tensada, arka kadranda 2 mm'lik perforasyon oluşturuldu. Kulak zarlarının kapanma süresini uzatmak amacıyla koterle termal perforasyon tercih edildi (Ellman Surgitron, Ellman International, Inc., ABD). Sağ kulak zarındaki perforasyon üzerine 28 mmol/L askorbik asit emdirilmiş spongostan beş dakika süreyle uygulandı.^[7] Sol kulak zarına ise serum fizyolojik emdirilmiş spongostan uygulandı ve sıçanlar uyandırıldı. Topikal askorbik

asit ve serum fizyolojik uygulaması 48 saat sonra tekrarlandı. Sıçanların ameliyat mikroskobu ile günlük otoskopik muayeneleri yapıldı ve perforasyonların kapanma süreleri belirlendi. Yara iyileşmesinin kritik günleri olan 5, 7, 10 ve 12. günlerde iyileşme kriterlerinin histopatolojik olarak karşılaştırılabilmesi için, kulak zarlarının her ikisi de kapanmamış olan birer sıçanın yaşamı anestezi altında sonlandırıldı. Bu dört sıçanın kulak zarları perforasyon kapanma süresi yönünden değerlendirmeye alınmadı. Orta kulak ve kulak zarları bütün halde diseke edilerek %10'luk formolde fikse edildi. Patoloji laboratuvarında dokuların tamamı tekrar diseke edildikten sonra, kulak zarları doku takip cihazında rutin işleme alındı. Kesitler hematoksilin-eosin ile boyanıp entellan ile kapatıldı ve ışık mikroskobu altında polimorf nüveli lökosit artışı, damar proliferasyonu, epitelde proliferasyon ve keratin artışı yönünden değerlendirildi.^[2] Her bir parametre için, bir büyük büyütme alanının %25'inin kaplanması (+), %25-50'sinin kaplanması (++), %50-75'inin kaplanması (+++), %75-100'ünün kaplanması (+++++) olarak değerlendirildi.^[8] Her iki grupta perforasyon kapanma sürelerinin ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. İki grubun istatistiksel karşılaştırılmasında Student t- testi kullanıldı, p<0.05 anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Askorbik asit ve serum fizyolojik uygulanan gruplarda perforasyonların kapanma süreleri Tablo I'de gösterildi. Askorbik asit grubunda kulak zarlarının ortalama kapanma süresi 7.6±3.0 gün, serum fizyolojik grubunda 8.3±2.8 gün bulundu. Bu açıdan, iki grup arasında anlamlı farklılık bulunmadı (p=0.46).

Her iki kulak zarı da perfore iken 5, 7, 10 ve 12. günlerde yaşamları sonlandırılan dört sıçanda histopatolojik iyileşme ölçütleri arasında da dikkat çekici farklılık bulunmadı (Tablo II).

TABLO I
ASKORBİK ASİT VE SERUM FİZYOLOJİK UYGULANAN SIÇAN KULAKLARINDA PERFORASYONLARIN KAPANMA SÜRELERİ

	5. gün	7. gün	10. gün	12. gün
Askorbik asit (18 kulak)	8	4	3	3
Serum fizyolojik (18 kulak)	6	2	8	2

TABLO II

ASKORBİK ASİT VE SERUM FİZYOLOJİK UYGULANAN SIÇAN KULAKLARINDA YARA İYİLEŞMESİNİN HİSTOPATOLOJİK ÖLÇÜTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Histopatolojik ölçütler	Uygulanan tedavi	5. gün	7. gün	10. gün	12. gün
Polimorf nüveli lökosit	Askorbik asit	+	-	-	-
	Serum fizyolojik	++	+	-	-
Damar proliferasyonu	Askorbik asit	-	+	+	-
	Serum fizyolojik	-	-	-	-
Epitelde proliferasyon	Askorbik asit	-	+	++	++
	Serum fizyolojik	-	-	+	+
Keratin artışı	Askorbik asit	-	+	++	++
	Serum fizyolojik	-	-	+	+

TARTIŞMA

Askorbik asit veya C vitamini, folik asidin folinik aside dönüşmesi, karbonhidrat ve tirozin metabolizması, lipid ve proteinlerin sentezi ve direnç gelişiminde rol oynar.^[9] Yara iyileşmesi, kollajenin başlıca bileşeni olduğu bağ dokusu sentezi ile gerçekleşmektedir. Askorbik asit, bağ dokusu sentezinde önemli biyolojik ve metabolik fonksiyonlara sahiptir. Yara iyileşmesinin üç ana maddesini, lizin, prolin ve askorbik asit oluşturmaktadır.^[9,10] Askorbik asit bu iki aminoasidin hidroksilasyonu için gereklidir.^[9] Primer yara iyileşmesinde, üçüncü günde granülasyon dokusu yara ağızlarında belirgin hale gelir ve kollajen lifler görülmeye başlar. Beşinci gün yara mesafesi granülasyon dokusu ile dolar ve damarlanma en yüksek düzeye çıkar. İkinci haftada ise, kollajen ve fibroblast çoğalması devam eder, lökosit infiltrasyonu, ödem ve damarlanma artışı büyük oranda kaybolur.^[8]

Askorbik asidin yara iyileşmesi üzerine etkilerini inceleyen çalışmaların büyük kısmında diyetdeki miktarının artırılması yoluna gidilmiştir; topikal uygulamanın yara iyileşmesi üzerine etkilerini konu alan çalışmaların sayısı oldukça azdır.^[7] Saika ve ark.^[3] tavşan korneasında deneysel yolla oluşturulan alkali yanıklara topikal askorbik asit uygulamışlar ve elektron mikroskopu ile yapılan incelemelerde yeni epitel oluşumu göstermişlerdir. Petroustos ve Pouliquen^[11] ise korneanın alkalin yanıklarında %2'lik topikal askorbik asit uygulamasının korneada ülser ve perforasyon gelişimini azalttığını göstermişlerdir.

Askorbik asidin kulak zarında iyileşme üzerine etkisini inceleyen tek çalışma Spratley ve ark.na^[7]

aittir. Bu çalışmada sıçan kulak zarında deneysel yolla oluşturulan perforasyona topikal askorbik asit uygulanmış ve kontrol grubuna kıyasla daha az miringoskleroz gelişimi gösterilmiştir.

Askorbik asidin kulak zarındaki iyileşme üzerine olan etkisinin birkaç mekanizma ile olduğu öne sürülmektedir. Travmatik perforasyon geliştirilen kulak zarlarında oksijen konsantrasyonunun artırılmasının yara iyileşmesini bozarak miringoskleroz gelişimine neden olduğu; kulak zarına uygulanan askorbik asidin ise antioksidan etki ile yara iyileşmesine olumlu katkı yaptığı öne sürülmüştür.^[7] Askorbik asidin diğer bir etki mekanizması ise demir iyonları üzerinedir. Yara dokusundaki fazla demir iyonlarının iyileşmeyi olumsuz etkilediği bilinmektedir.^[12] Yara dokusuna askorbik asit uygulaması dokudaki demir iyonlarının azalmasına neden olmakta ve iyileşmeye olumlu katkıda bulunmaktadır.^[13] Ayrıca, askorbik asit yara dokusunda nitrik oksit (NO) benzeri etki göstererek vazodilatasyonu ve damarlanmayı da artırmaktadır.^[14] Askorbik asidin damar endotel hücrelerinden NO sentezini artırdığı da gösterilmiştir.^[15] Spratley ve ark.^[7] askorbik asit uygulanan perforasyon kulak zarlarında damarlanma artışı göstermişlerdir. Çalışmamızda da, askorbik asit uygulanan kulak zarlarında, serum fizyolojik uygulanan kulak zarlarına kıyasla 7. ve 10. günlerde daha fazla damarlanma artışı gözlenmiştir. Yara iyileşmesinin diğer histopatolojik ölçütlerinden epitel proliferasyonu ve keratin artışı da askorbik asit uygulanan grupta niceliksel olarak daha fazla bulunmuştur. Ancak yara iyileşmesinin belli başlı dört ölçütü göz önüne alındığında, iki uygulama grubu arasında dikkat çekici bir farklılık gözlenmemiştir.

Deneysel çalışmaların büyük çoğunluğunda kulak zarlarında oluşturulan perforasyonlar, yeni oluşturulan travmatik perforasyonlardır. İnsan kulak zarındaki kronik perforasyonlar ise kötü damarlanmaya sahip, kenarlarında hiyalinize fibröz doku bulunan, hücresel aktivitesi düşük perforasyonlardır.^[16] Bu nedenle, hayvan çalışmalarında akut perforasyonların iyileşmesi üzerine etkili bulunan ilaçlar insandaki kronik perforasyonların iyileşmesi üzerine aynı etkiyi göstermeyebilirler. Ayrıca, topikal kullanılan askorbik asidin insan kulak zarındaki kronik perforasyonların tedavisinde denenebilmesi için öncelikle ototoksisitesinin araştırılması gerekir. Literatürde bu konuda yapılmış hayvan çalışmasına rastlamadık.

Sonuç olarak, sıçan kulak zarında deneysel olarak oluşturulan perforasyona topikal olarak uygulanan askorbik asit, hem perforasyonun kapanma süresi hem de yara iyileşme dokusundaki histopatolojik değişiklikler açısından etkili bulunmamıştır. Ancak askorbik asidin kulak zarındaki iyileşme üzerine etkisi ile ilgili çok az araştırma olduğundan, kullanılan doz ve sıklık konusunda yerleşmiş bir uygulama da bulunmamaktadır. Bu nedenle, uygulama şeklinde yapılabilecek değişikliklerin farklı sonuçlar verebileceğini de göz ardı etmemek gerekir.

KAYNAKLAR

1. Chauvin K, Bratton C, Parkins C. Healing large tympanic membrane perforations using hyaluronic acid, basic fibroblast growth factor, and epidermal growth factor. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;121:43-7.
2. Uslu B, Seven H, Dadaş B, Başak T, Çınar U, Özdoğan HC ve ark. Kobaylarda (guinea pig) topikal mitomisin C uygulamasının miringotomi üzerine etkisi. *KBB Klinikleri* 2001;3:135-42.
3. Saika S, Uenoyama K, Hiroi K, Tanioka H, Takase K, Hikita M. Ascorbic acid phosphate ester and wound healing in rabbit corneal alkali burns: epithelial basement membrane and stroma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;231:221-7.
4. Vaxman F, Chalkiadakis G, Olender S, Maldonado H, Aprahamian M, Bruch JF, et al. Improvement in the healing of colonic anastomoses by vitamin B5 and C supplements. Experimental study in the rabbit. *Ann Chir* 1990;44:512-20. [Abstract]
5. Kim M, Otsuka M, Yu R, Kurata T, Arakawa N. The distribution of ascorbic acid and dehydroascorbic acid during tissue regeneration in wounded dorsal skin of guinea pigs. *Int J Vitam Nutr Res* 1994;64:56-9.
6. Collins CK, Lewis AE, Ringsdorf WM Jr, Cheraskin E. Effect of ascorbic acid on oral healing in guinea pigs. *Int Z Vitaminforsch* 1967;37:492-5.
7. Spratley JE, Hellstrom SO, Mattsson CK, Pais-Clemente M. Topical ascorbic acid reduces myringosclerosis in perforated tympanic membranes. A study in the rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001;110:585-91.
8. Yavuz E, Cınar U, Seven H, Vural C, Senvar A. The effect of type 1 diabetes mellitus on the closing of rat tympanic membrane perforation. [Article in Turkish] *Kulak Bunu Bogaz Ihtis Derg* 2001;8:458-62.
9. Silverstein RJ, Landsman AS. The effects of a moderate and high dose of vitamin C on wound healing in a controlled guinea pig model. *J Foot Ankle Surg* 1999;38:333-8.
10. Kayaalp SO. Suda çözünen vitaminler. In: Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 9. baskı, Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık; 2000. s. 1564-75.
11. Petroutsos G, Pouliquen Y. Effect of ascorbic acid on ulceration in alkali-burned corneas. *Ophthalmic Res* 1984;16:185-9.
12. Ackerman Z, Seidenbaum M, Loewenthal E, Rubinow A. Overload of iron in the skin of patients with varicose ulcers. Possible contributing role of iron accumulation in progression of the disease. *Arch Dermatol* 1988;124:1376-8.
13. Vaxman F, Olender S, Lambert A, Nisand G, Grenier JF. Can the wound healing process be improved by vitamin supplementation? Experimental study on humans. *Eur Surg Res* 1996;28:306-14.
14. Jackson TS, Xu A, Vita JA, Keaney JF Jr. Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ Res* 1998;83:916-22.
15. Heller R, Munscher-Paulig F, Grabner R, Till U. L-Ascorbic acid potentiates nitric oxide synthesis in endothelial cells. *J Biol Chem* 1999;274:8254-60.
16. Laurent C, Hellstrom S, Fellenius E. Hyaluronan improves the healing of experimental tympanic membrane perforations. A comparison of preparations with different rheologic properties. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1988;114:1435-41.