

Kserostomili Sıçanlarda Deneysel Reflü ve Yapay Tükürüğün Östaki Tüpü Üzerindeki Etkileri

The Effects of Gastric Reflux and Artificial Saliva on Eustachian Tube Functions in a Xerostomised Rat Model

Mustafa TÜZ,^a
Tamara AKSU,^b
Giray AYNALI,^a
Murat YARIKTAŞ,^a
Hasan YASAN^a
Alpaslan GÖKÇİMEN,^c
Fatih ÜNAL^a

^aKBB ve Baş Boyun Cerrahisi AD,
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi, Isparta

^bKBB ve Baş Boyun Cerrahisi AD,
Erzurum Oltu Devlet Hastanesi,
Erzurum

^cHistoloji AD,
Adnan Menderes Üniversitesi
Tıp Fakültesi, Aydın

Geliş Tarihi/Received: 03.01.2012

Kabul Tarihi/Accepted: 06.09.2012

Yazışma Adresi/Correspondence:

Giray AYNALI
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
KBB ve Baş Boyun Cerrahisi AD,
Isparta,
TÜRKİYE/TURKEY
giraynali@yahoo.com

ÖZET Amaç: Bu çalışma ile sialoadenektomili sıçanlarda tekrarlayan nazofaringiyal HCl/Pepsin infüzyonunun östaki tüpü üzerindeki etkileri ve HCl/Pepsin uygulamasına karşı yapay tükürüğün koruyucu etkileri değerlendirilmiştir. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmaya 30 albino sıçan dâhil edilmiştir. Sıçanların tümüne sialoadenektomi uygulanmış ve sıçanlar, HCl/Pepsin ve/veya yapay tükürük verilip verilmemesine göre üç gruba ayrılmıştır. İlaç infüzyonunu yapabilmek için sıçanların tümünün nazofarenksine polietilen tüpler yerleştirilmiştir. Grup 1'deki (kontrol grubu) 8 sıçana NaCl, Grup 2'deki 7 sıçana pepsin HCL ve Grup 3'teki 9 sıçana pepsin HCL ve yapay tükürük verilmiştir. HCl/Pepsin uygulamasının yedinci gününde tüm hayvanlar öldürülmüş ve östaki tüplerine ait kesitlerde, goblet hücrelerinin yoğunluğu, yeni hücrelerinin submukozal infiltrasyonu, submukozal bezlerdeki hasar, hipertrofi ve bağ dokusu artışı gruplar arasında karşılaştırılmıştır. **Bulgular:** Gruplar arasında goblet hücrelerinin yoğunluğu ve bağ dokusu artışı açısından fark saptanmamıştır. Submukozal düzeyde yeni hücrelerinin yoğunluğu, HCL-pepsin gruplarında (Grup 2 ve 3) kontrol grubundakinden (Grup 1) daha yüksek bulunmuştur. Bez hasarının sadece HCL-pepsin verilen grupta (Grup 2) daha yüksek, diğer gruplarda (Grup 1 ve 3) birbirine benzer olduğu tespit edilmiştir. Bez hipertrofisi ise HCL-pepsin ve yapay tükürük verilen grupta (Grup 3) daha düşük, diğer gruplarda (Grup 1 ve 2) benzer bulunmuştur. **Sonuç:** Bu çalışma, deneysel kserostomili sıçanlarda HCl ve pepsin uygulamasının erken dönemde submukozal bez hasarını artırdığını, ayrıca yapay tükürüğün, sıçanlardaki östaki borusunu, HCl ve pepsinin etkileri olan bez hipertrofisinden ve özellikle paratubal bez hasarından koruduğunu, ancak bağ dokusu artışı ve submukozal düzeyde yeni hücrelerinin infiltrasyonu üzerinde olumlu etkisi olmadığını ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Gastroözofageal reflü; kserostomi; östaki borusu; salya, yapay

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of repetitive nasopharyngeal HCl/Pepsin infusion on Eustachian tube and protective effects of artificial saliva against HCl/Pepsin in sialoadenectomised rats. **Material and Methods:** Thirty albino sialoadenectomised rats were divided into three groups. Group 1 was defined as the control group. The rats in Group 2 were administered HCl/Pepsin and in Group 3 HCl/Pepsin plus artificial saliva. On the seventh day of HCl/Pepsin exposure all animals were sacrificed and cross section of Eustachian tube specimens were obtained. Specimens were examined for goblet cell density, submucosal inflammatory cell infiltration, hypertrophy and degeneration level of the submucosal glands and submucosal connective tissue thickening and findings were compared between groups. **Results:** There was no difference between groups regarding goblet cell density and fibrous tissue proliferation. Submucosal inflammatory tissue density was higher in Group 2 and 3 than in the control group (Group 1). Submucosal gland damage was higher in HCL-pepsin group (Group 2) compared to Group 1 and 3. In contrast, submucosal gland damage was similar in Group 1, 2, and 3. Submucosal gland hypertrophy was lower in HCL-pepsin and artificial saliva group (Group 3) than in Group 1 and 2 but it was similar in Group 1 and 2. **Conclusion:** The experimental gastric reflux (HCL-pepsin) may increase submucosal gland damage. Artificial saliva may protect the Eustachian tube from gland hypertrophy and gland damage in early stages of experimental xerostomia in rats. Artificial saliva has no beneficial effects on fibrous tissue proliferation and submucosal tissue infiltration.

Key Words: Gastroesophageal reflux; xerostomia; eustachian tube; saliva, artificial

doi: 10.5336/medsci.2012-28156

Copyright © 2013 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2013;33(1):39-48

Tükürük, majör ve minör tükürük bezleri tarafından salgılanan, su ve elektrolitler ile beraber epidermal büyüme faktörü, prostaglandin E2 ve müsün gibi organik maddeleri de içeren bir sıvıdır. Üst solunum yolu lümeninde kaygan bir yüzey oluşturarak kuruluğa ve çevredeki tahriş yaratan maddelere karşı epiteli koruyucu bir görev üstlenir. Aynı zamanda epitel hücrelerini, yüzeylerine tutunmuş bakterilerin proteazlarından da korur.¹ İçeriğindeki karbonik anhidraz 6 enzimi, tükürüğün bikarbonatını kullanarak ortamdaki asidite fazlasını nötralize eder.²

Mukus ve tükürük miktarını azaltan, yani kserostomiye yol açan durumlar aynı zamanda özofagusta motilite bozukluğuna ve özofagus mukoza direncinin azalmasına da yol açabilmektedirler. Bu da ekstraözofagal reflü riskinin artmasına ve tükürüğün de eksikliğine bağlı olarak üst solunum yolunda efüzyonlu otitis media, rekürren otitis media, sinüzit, laringofarenjit, özofajit gibi komplikasyonlara da neden olabilmektedir.³ Klinik olarak bu hastalık sindirim sistemine ait bulgularla ortaya çıkabileceği gibi, alt ya da üst solunum sistemine ait bulgularla da ortaya çıkabilir.⁴ Özellikle çocuklarda efüzyonlu otitis media ve rekürren otitis media için olası nedenler arasında bildirilmektedir.⁵⁻¹¹

Bu çalışmada, deneysel olarak oluşturulmuş ekstraözofagal reflüsü olan kserostomili sıçanlarda yapay tükürüğün, akut dönemde östaki fonksiyonları üzerindeki koruyucu etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla sialoadenektomili sıçanların östaki histopatolojisi incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel Hayvan Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda (HÜDAL) gerçekleştirildi. Çalışma esnasında 5199 numaralı "Hayvanları Koruma Kanunu" ve Helsinki Nihai Senedi'nin (1986) deneysel hayvanları ile ilgili maddelerine uyuldu. Çalışmada, ağırlıkları 280-350 gram arasında değişen, sağlıklı, timpanogram ve otomikroskopileri olağan olarak izlenen, 30 adet Wistar tipi albino sıçan, onarlı üç gruba ayrıldı. Sıçanlar çalışma boyunca ayrı kafeslerde, 12 saat aydınlık-12 saat karanlıkta, 21-22°C

sıcaklıkta, serbest yemek ve su alabildikleri bir ortamda barındırıldı.

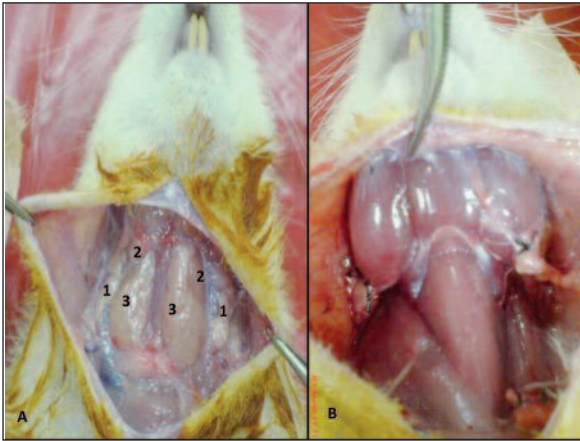
Tüm gruplardaki sıçanlara, nazofarinkse ilaç infüzyonu uygulamak amacıyla, Ketamin+Xylazin (90/10 mg IP) anestezisi altında 0,8 mm çapında polietilen tüpler yerleştirildi. Öncelikle nazal kemiklerin orta hattındaki cilde insizyonla girildi. Tüpler cilt altından ilerletilerek sol nazal kaviteye, bir uçları nazofarinkse gelecek şekilde tek taraflı olarak implante edildi ve sütürlenerek sabitlendi. Transoral olarak tüp ucunun yumuşak damağı geçtiği ve östaki ağzının 4 mm yakınına ulaştığı izlendi. Postoperatif birinci haftada otomikroskopi ve timpanogram yenilenerek, değerleri normal olmayan sıçanlar çalışma dışında bırakıldı. Tüm gruplara bilateral parotis bezi, submandibüler-sublingual bez kompleksi eksizyonu (Sialoadenektomi) uygulandı (Cheyne cerrahi prosedürü modifikasyonu) (Resim 1).¹² Daha sonra sırasıyla gruplara şu uygulamalar yapıldı (Tablo 1);

Grup 1: Bilateral sialoadenektomi yapıldı. Post-operatif 5. günden itibaren fosfat tamponlu %0,9 NaCl, 7 gün boyunca 2x20 dk/gün şeklinde ve 1 mL/sa hızında nazofarinkse infüzyonla verildi.

Grup 2: Bilateral sialoadenektomi yapıldı. Post-operatif 5. günden itibaren yapay gastrik sıvı 0,01 HCl (%37 SİGMA FLUKA)/0,5 mg/mL Pepsin (MERCK) 7 gün süre ile 2x20 dk/gün şeklinde 1 mL/sa hızında infüzyon ile nazofarinkse uygulandı.

Grup 3: Bilateral sialoadenektomi yapıldı. Post-operatif 5. günden itibaren yapay gastrik sıvı 0,01 HCl/0,5 mg/mL Pepsin 7 gün süre ile 2x20 dk/gün şeklinde ve 1 mL/sa hızında infüzyon ile nazofarinkse uygulandı. Grup 3'ten farklı olarak 'ad libitum' suyun yanı sıra yapay tükürük (SALIVART® (Gebauer Oral Moisturizer), 0,01 HCl/0,5 mg/mL Pepsin uygulanmasından 5 dakika önce ve sonra polietilen tüpten 10 mL/sa 4x5 dk/gün olacak şekilde infüzyonla verildi.

HCl ve Pepsin uygulama işleminin 7. gününde tüm gruplardaki sıçanlara (5 grup, n=43) Ketamin+Xylazin (90/10 mg İP) anestezisi altında timpanogram ve otomikroskopi uygulandı, değerler kaydedildi ve ardından sıçanlar dekapite edildi. Sıçanlar, %4'lük paraformaldehit solüsyonunun sol kardiyak



RESİM 1: a) Sıçanın majör tükürük bezlerinin fotografik görünümü (1- Parotit bezler, 2- Sublingual bezler, 3- Submandibüler bezler), **b)** Sialoadenektomiden sonra cerrahi bölgenin görünümü.

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

ventriküle verilmesi ile perfüzyon fiksasyon yöntemi uygulanarak fikse edildikten sonra, tümünün bilateral timpanik bulla ve östaki örnekleri çıkarıldı. Örnekler %4'lük paraformaldehit solüsyonunda en az 24 saat süreyle fikse edildi. Dokudaki kemik yapılarının yumuşatılması için fiksatiften alınan dokular %10'luk formik asit çözeltisinde 12 saat boyunca dekalsifiye edildi. Ardından 12 saat akan suda yıkama işlemine tabi tutulduktan sonra, dehidratasyon, şeffaflaştırma, emdirme ve gömme işlemlerinden geçirildi.

Gömme işleminden önce örneklerde östaki, bulladan timpanik orifis korunacak şekilde bistüri ile ayrıldı. Takip işlemine alınmadan önce östakinin nazofaringiyal ve timpanik orifisi incelenmek üzere, örnekler östaki uzun aksına dik olarak ikiye bölündü. Her kulak için nazofaringiyal ostium komşuluğundan (N) ve timpanik kavite ostium

komşuluğundan (T) olmak üzere iki parafin blok hazırlandı. Hazırlanan parafin bloklardan, Leica tipi kızaklı mikrotom kullanılarak 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Histolojik değerlendirme için preparatlar Hematoksilen-Eozin (HE) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boya ile boyandı. Boyanan örnekler Olympus BX50 tipi binoküler mikroskopta incelendi ve fotoğraflar elde edilerek değerlendirildi.

Östakiye ait histolojik materyaller aşağıdaki parametrelere göre değerlendirildi;

A- Goblet hücrelerinin yoğunluğu (Östakinin 1 mm'sinde sayı olarak)

B- Submukozal yangı hücrelerinin infiltrasyon düzeyi (0- yok, 1- minimal, 2- orta, 3-şiddetli)

C- Submukozal sero-müsinöz bezlerin hasar düzeyi (0- yok, 1- minimal, 2-orta, 3-şiddetli)

D- Submukozal sero-müsinöz bezlerin hipertrofi düzeyi (0- yok, 1- minimal, 2-orta, 3-şiddetli)

E- Bağ dokusu artışı düzeyi (0- yok, 1- minimal, 2-orta, 3-şiddetli)

Elde edilen değerler için gruplar arasında karşılaştırmalar Mann Whitney U testi ile ve grup içi (aynı grupta sağ-sol kulaklar arası, N-T bölgeleri arası) Wilcoxon testi ile yapıldı. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak belirlendi.

BULGULAR

Sıçanlar, tüplerin yerleştirilmesinin ardından 1 hafta süre ile herhangi bir işlem yapılmadan takip edildiler. Birinci haftanın sonunda timpanogram ve otomikroskopiler tekrarlandı. Timpanogram ve otomikroskopik bulguları olağan olmayan 2 sıçan

TABLO 1: Gruplardaki ratlara yapılan uygulamalar, n; uygulamalar sonrası histopatolojik incelemeye alınan rat sayısı.

Gruplar	Grup 1 Kserostomi	Grup 2 Kserostomi Reflü	Grup 3 Kserostomi Reflü Tükürük
Nazal polietilen tüp tatbiki	+	+	+
Fosfat tamp. %0.9 NaCl uygulama	+	-	-
Sialoadenektomi	+	+	+
HCl+ Pepsin uygulaması	-	+	+
Yapay tükürük uygulaması	-	-	+
n	8	7	9

çalışmadan çıkarıldı. Sıçanlardan 9'u Grup 1, 9'u Grup 2, 10'u da Grup 3'e dâhil edildi. Grup 1'deki 1 adet sıçan, sialoadenektomi bölgesinde apse tespit edilmesi üzerine çalışma dışında bırakıldı. Grup 2 ve 3'teki birer adet sıçan ise %20'yi aşan ağırlık kaybı nedeni ile çalışmadan dışlandı. Grup 2'teki 1 adet sıçan ölü bulundu (ölüm nedeni malnütrisyon olarak tahmin edildi).

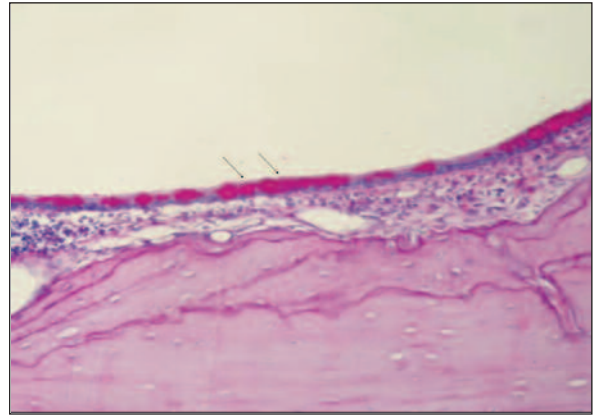
Sonuç olarak histolojik çalışma 24 sıçanda gerçekleştirildi. İkinci ve 3. gruplara yapay gastrik sıvı uygulamasının yedinci gününde tüm sıçanlar dekapite edildi. Dekapite edilen sıçanların 8'i kontrol grubu olan Grup 1'e, 7'si Grup 2'ye, 9'u Grup 3'e aitti (Tablo 1). Sıçanların tümünün her iki kulağı için östakinin N ve T bölümünden olmak üzere 4 adet histolojik örnek çalışıldı; toplam olarak 96 örnek incelendi.

A. 'N'-'T' bölge ayrımı ve sağ-sol kulak ayrımı yapmaksızın bütüncül olarak gruplar karşılaştırıldığında;

1. Goblet hücrelerinin sayısı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Resim 2).

2. Submukozal yangı hücresi infiltrasyonu HCL gruplarında (Grup 2 ve 3) kontrol grubuna göre (Grup 1) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha yüksekti. Fakat Grup 2 ile 3 arasında bir fark yoktu (Tablo 2).

3. Submukozal bez hasarı Grup 2'de Grup 1 ve 3'e göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha faz-



RESİM 2: Grup 4'teki bir sıçanın östaki tüpünün 'T' bölgesine ait epitelde goblet hücrelerinin yoğunluğunda ve hacminde artış izlenmekte (HEX40). (Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

laydı. Fakat Grup 1 ile 3 arasında bir fark yoktu (Tablo 2).

4. Submukozal bez hipertrofisi Grup 1 ve 2 ile kıyaslandığında Grup 3'e göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde daha azdı. Fakat Grup 1 ile 2 arasında bir fark yoktu (Tablo 2).

5. Bağ dokusu artışı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 2).

B. Bu parametreler her grubun kendi içinde sağ-sol kulaklar için karşılaştırıldığında, sol kulaklarda Grup 1'de submukozal yangı hücresi infiltrasyonu, bez hasarı ve bez hipertrofisi parametrelerinde, Grup 2'de bez hipertrofisi parametresinde ve Grup 3'te bez hipertrofisi ve bez hasarı

TABLO 2: Gruplar arasındaki submukozal inflamatuvar hücre infiltrasyonu, bez hasarı, bez hipertrofisi ve bağ doku artışı parametrelerinin karşılaştırılması ($p < 0,05$ anlamlı).

	Grup1 <-> Grup2 medyan (min-maks) p değeri	Grup1<->Grup3 medyan (min-maks) p değeri	Grup2 <-> Grup3 medyan (min-maks) p değeri
Submukozal inflamatuvar hücre infiltrasyonu	1(0-2) <->2(0-3) p <0,001	1(0-2) <->2(0-3) p <0,001	2(0-3) <->2(0-3) p=0,457
Submukozal bez hasarı	0(0-1) <->1(0-2) p <0,001	0(0-1) <->0(0-1) p=0,259	1(0-2) <->0(0-1) p <0,001
Submukozal bez hipertrofisi	1(0-2) <->1(0-2) p=0,476	1(0-2) <->1(0-2) p=0,006	1(0-2) <->1(0-2) p=0,006
Bağ doku artışı	1(0-2) <->1(0-3) p=0,120	1(0-2) <->1(0-3) p=0,305	1(0-3) <->1(0-3) p=0,589

TABLO 3: Aynı grupta sağ-sol kulaklar arasında submukozal inflamatuvar hücre infiltrasyonu, bez hasarı, bez hipertrofisi ve bağ doku artışı parametrelerinin karşılaştırmalı test sonuçları ($p < 0,05$ anlamlı).

	Grup 1 Sağ<->Sol medyan (min-maks) p değeri	Grup 2 Sağ<->Sol medyan (min-maks) p değeri	Grup 3 Sağ<->Sol medyan (min-maks) p değeri
Submukozal inflamatuvar hücre infiltrasyonu	1(1-2) <->1(0-2) p=0,002	1,5(1-3) <->2(0-3) p=0,115	2(0-2) <->2(1-3) p=0,346
Submukozal bez hasarı	0(0-1) <->0(0-1) p < 0,001	1(0-2) <->1(0-2) p=0,002	0(0-1) <->0(0-1) p < 0,001
Submukozal bez hipertrofisi	1(0-2) <->1(0-2) p < 0,001	1(0-2) <->1(0-2) p=0,007	1(0-1) <->1(0-2) p < 0,001
Bağ doku artışı	1(0-2) <->1(0-2) p=0,005	1(0-3) <->1(0-2) p=0,167	1(0-2) <->2(0-3) p=0,005

parametrelerinde sağ kulaklara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede bir yükseklik saptandı (Tablo 3).

C. Bu parametreler her grubun kendi içinde N ve T bölgeleri için karşılaştırıldığında, N bölgesinde Grup 1'de bütün parametrelerde, Grup 2'de bez hasarı parametresinde ve Grup 3'te bez hipertrofisi ve bez hasarı parametrelerinde T bölgesine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede bir yükseklik saptandı (Tablo 4).

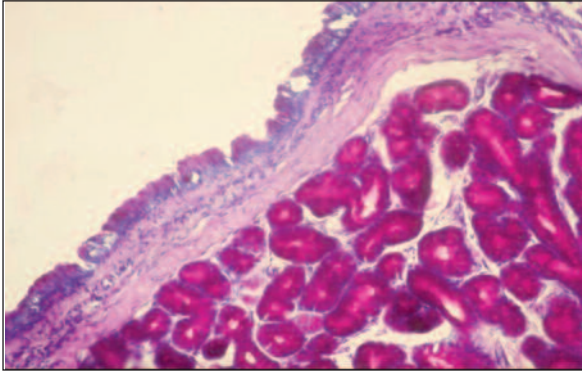
D. N bölgesi için ikili karşılaştırmalarda Grup 2 ve 3'te submukozal yangı hücresi infiltrasyonu ve Grup 2'de bez hasarı anlamlı derecede daha yüksek bulundu. Grup 3'te submukozal bez hasarı Grup

2'ye göre anlamlı düzeyde daha azdı (Resim 4). Grup 2'de submukozal bez hipertrofisi Grup 3'te olduğu gibi artmış olsa da, sadece Grup 3'te istatistiksel olarak Grup 1'de olduğundan daha yüksekti (Resim 3). Gruplar arasında bağ dokusu artışı açısından fark saptanmadı (Tablo 5).

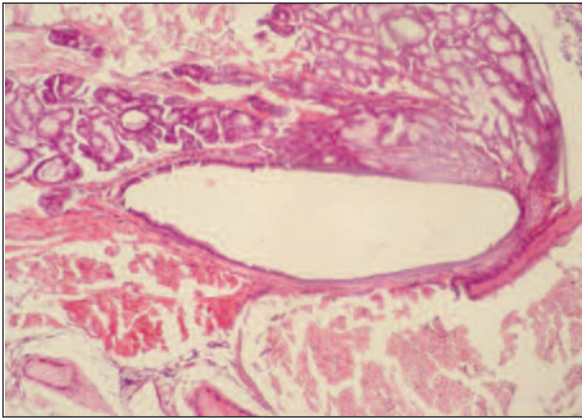
E. T bölgesi için ikili karşılaştırmalarda Grup 2 ve 3'te submukozal yangı hücresi infiltrasyonu (Resim 5) ve Grup 2'de bez hasarı anlamlı derecede daha yüksek saptandı. Grup 1'de submukozal bez hipertrofisi Grup 2'de olduğu gibi artmış olsa da, sadece Grup 2'de istatistiksel olarak Grup 3'te olduğundan daha yüksekti. Gruplar arasında bağ dokusu artışı açısından fark saptanmadı (Tablo 5).

TABLO 4: Aynı grupta N ve T bölgeleri arasında submukozal inflamatuvar hücre infiltrasyonu, bez hasarı, bez hipertrofisi ve bağ doku artışı parametrelerinin karşılaştırmalı test sonuçları ($p < 0,05$ anlamlı).

	Grup 1 N<->T medyan(min-maks) p değeri	Grup 2 N<->T medyan(min-maks) p değeri	Grup 3 N<->T medyan(min-maks) p değeri
Submukozal inflamatuvar hücre infiltrasyonu	1(0-1) <->1(0-2) p < 0,001	1,5(0-3) <->2(1-3) p=0,090	1(0-2) <->2(1-3) p=0,285
Submukozal bez hasarı	0(0-1) <->0(0-1) p < 0,001	1(0-2) <->1(0-2) p=0,002	0(0-1) <->0(0-1) p < 0,001
Submukozal bez hipertrofisi	1(0-2) <->1(0-2) p=0,001	1(0-2) <->1(0-2) p=0,140	1(0-1) <->1(0-2) p < 0,001
Bağ doku artışı	1(0-2) <->1(0-2) p=0,001	1(0-3) <->1(0-2) p=0,149	1,5(0-3) <->1(0-2) p=0,051



RESİM 3: Grup 4'teki bir sıçana ait sağ östaki tüpünün 'N' bölgesinde epitel ve paratübül bezler olağan görünümde, ancak submukozal bölgede yangı hücrelerinin infiltrasyonu belirgin düzeyde (PAS x20).
(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



RESİM 4: Grup 2'deki sıçana ait sol östaki tüpünün 'N' bölgesinin mediyali düzeyinde belirgin paratübül bez hipertrofisi, minimal submukozal yangı hücreleri infiltrasyonu (HEx10).
(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

F. İkili karşılaştırmalarda sağ kulaklar için Grup 2 ve 3'te submukozal yangı hücreleri infiltrasyonu diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede daha yüksekti. Bez hasarı Grup 1 ve Grup 3 ile karşılaştırıldığında Grup 2'de anlamlı derecede daha fazla bulundu. Bez hipertrofisi ve bağ dokusu artışı açısından gruplar arasında bir fark yoktu. Sol kulaklar için Grup 2 ve 3'te submukozal yangı hücreleri infiltrasyonu anlamlı derecede daha yüksek saptandı. Bez hasarı, Grup 1 ile karşılaştırıldığında Grup 2'de ve Grup 3 ile karşılaştırıldığında Grup 1'de anlamlı ölçüde daha fazlaydı. Submukozal bez hipertrofisi, Grup 1 ve 2'de Grup 3'tekine göre anlamlı düzeyde daha yüksekti. Grup 1'de bağ dokusu artışı diğer gruplara göre daha azdı (Tablo 6).

TARTIŞMA

Kserostomiye bağlı olarak östaki ve orta kulakta görülen hastalıklar genel olarak östaki disfonksiyonu ve efüzyonlu otitis media şeklinde kendini gösterir. Disfonksiyonun nedeni olarak, östakideki paratübül sero-müsinöz bezler, intraepitelyal bezler, goblet hücreleri ve silialı hücrelerdeki hasar ve östaki çevresindeki dokulardaki fibrotik değişiklikler gösterilmektedir.¹³⁻¹⁵

Sıçanlarda tüm majör tükürük bezlerinin çıkarılması tükürük hacmini %75 azaltarak ciddi kserostomiye neden olur iken, insanlarda çok daha sınırlı problemlere bağlı olarak tükürük salgısı %40-50 azaldığında kserostomi kliniği ortaya çıkarılır.^{16,17}

Östaki fonksiyonlarını olumsuz olarak etkileyen bir diğer faktör ise ekstraözofagal reflüdür. Efüzyonlu hastaların kulak efüzyon sıvısında pepsin/pepsinojen veya *Helicobacter pylori* bakterisinin saptanması, reflü tanısının konması, reflü öyküsü olan hastalarda orta kulak patolojilerinin ortaya konması, gastrik sıvı verilerek veya cerrahi ile deneysel olarak reflü oluşturulan hayvan modellerinde östaki disfonksiyonunun veya efüzyonlu otitis media oluştuğunun gösterilmesi bu ilişkiyi açıkça ortaya koymaktadır.^{5,10,18-23}

Çalışmamızda, David White ve ark.nın tanımladığı deneysel gastrik reflü modeli kserostomili sıçanlarda uygulanarak, erken dönemde östaki borusunda ortaya çıkan histopatolojik değişiklikler değerlendirilmiştir.⁵ Majör tükürük bezleri tümüyle çıkarılan ve aside maruz bırakılan sıçanların uzun süre yaşatılması mümkün olmayacağından, çalışma sadece erken dönemle (1 hafta) sınırlı tutulmuştur.

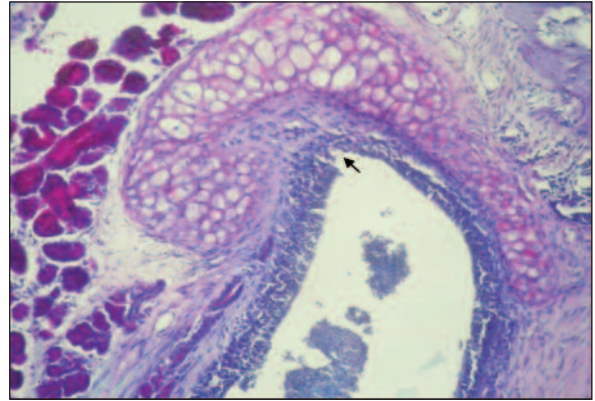
Östaki epiteli, nazofarinkteki psödostratifiye mukosilier epitele benzer şekilde, goblet hücreleri, silialı ve silialı olmayan hücreler ve bazal membran üzerindeki bazal hücrelerden oluşur. Mukosilier epitel östakinin tabanında yer alır ve nazofarinkse doğru gidildikçe kapladığı alan genişler. Timpanuma gidildikçe ise yoğunluğu azalır. Tüpün çatısını keratinize olmayan skuamöz epitel kaplar ve timpanik kaviteye doğru gidildikçe kapladığı alan

TABLO 5: 'N' ve 'T' bölgeleri için gruplar arası submukozal inflamatuvar hücre infiltrasyonu, bez hasarı, bez hipertrofisi ve bağ doku artışı parametrelerinin karşılaştırma sonuçları ($p < 0,05$ anlamlı) (Betimleyici değerleri Tablo 4'te verilmiştir.)

p değeri	Grup1 <-> Grup2		Grup1 <-> Grup3		Grup2 <-> Grup3	
	N	T	N	T	N	T
Submukozal inflamatuvar hücre infiltrasyonu	0,005	0,001	0,040	0,001	0,689	0,456
Submukozal bez hasarı	0,001	0,015	0,857	0,053	0,001	<0,001
Submukozal bez hipertrofisi	0,734	0,486	0,039	0,070	0,060	0,045
Bağ doku artışı	0,311	0,216	0,086	0,610	0,519	0,098

artır.²⁴⁻²⁶ Benzer şekilde bu çalışmada da, tüm gruplarda mukosilier epitelin kapladığı alanın ve goblet hücrelerinin yoğunluğunun, timpanik orifis düzeyinde nazofarengiyal orifise göre daha az olduğu tespit edilmiştir.

Caye-Thomasen ve Tos'un *Streptococcus pneumoniae* ile oluşturdukları akut otit atağı sırasında, erken dönemde goblet hücrelerinin hacim olarak küçük olduğu ve sayılarının değişmediği izlenmiştir (4. ve 8. günlerde). Östaki tıkanıklığı da mevcut ise orta kulak medial duvarında ve östaki kemik kısmındaki goblet hücrelerinin sayısında ve anormal müköz bez oluşumunda geç dönemde belirgin bir artış saptanmıştır.^{27,28} Caye Thomasen ve Tos bu çalışmalarında, enfeksiyona sekonder olarak östakide ortaya çıkan histopatolojik değişiklikler üzerinde odaklanmakla beraber, yangısal süreçte etkili olan mediyatörler, enfeksiyon ve gastrik reflünün sonucunda gelişen yangı için ortaktır.^{22,29,30} Enfeksiyondan farklı olarak ilk aşamada gastrik sıvı ile mukozanın doğrudan temasının ardından, gastrik sıvının düşük pH'sının etkisi ile silia stazı oluşmakta, pepsinin proteolitik etkisi ve aside bağlı olarak da ödem ve yangı ile kendini gösteren doku hasarı gelişmektedir. Böylelikle, mukosiliyer klirensin bozulması ve östaki borusundaki yangı, orta kulağın

**RESİM 5:** Grup 3'teki bir sıçana ait sağ östaki tüpünün 'T' bölgesinde belirgin submukozal yangı hücresi infiltrasyonu ve bu alanda yüzey epitelinde yangıya bağlı travmatik değişiklikler (ok ile işaretli); tüpün kraniyalinde kırık dokusu izleniyor (PASx20).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

ventilasyonunda bozulmayı tetiklemektedir.^{5,22} Caye-Thomasen ve Tos'un enfeksiyona sekonder olarak östakinin timpanik orifisi düzeyinde izledikleri, mukus glikoproteinlerinin goblet hücrelerinin sitoplazmalarında birikmesi ile oluşan kupa şeklindeki goblet hücreleri, bizim çalışmamızda da saptanmıştır (Resim 3) ve bu kesitlerde mukosilier epiteldeki goblet hücresi yoğunluğunun arttığı izlenmiştir; ancak, Caye-Thomasen ve Tos'un elde et-

TABLO 6: Sağ ve sol kulak için gruplar arası submukozal inflamatuvar hücre infiltrasyonu, bez hasarı, bez hipertrofisi ve bağ doku artışı parametrelerinin karşılaştırmalı test sonuçları ($p < 0,05$ anlamlı) (Betimleyici değerleri Tablo 4'te verilmiştir.)

p değeri	Grup1 <-> Grup2		Grup1 <-> Grup3		Grup2 <-> Grup3	
	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol
Submukozal inflamatuvar hücre infiltrasyonu	0,025	<0,001	0,025	<0,001	0,949	0,290
Submukozal bez hasarı	0,001	0,014	0,465	0,034	0,003	<0,001
Submukozal bez hipertrofisi	0,943	0,205	0,058	0,051	0,136	0,016
Bağ doku artışı	0,840	0,039	0,068	0,001	0,050	0,197

tiği bulgulardan farklı olarak, sıçanların hiçbirinde östaki çatısı düzeyinde patolojik goblet hücresine rastlanmamıştır. Caye-Thomasen ve Tos'un, akut otitte bakteri türlerine göre östakiye ait bezlerdeki değişiklikleri inceledikleri çalışmada, bakterinin türünden bağımsız olarak goblet hücresi dansitesinin 6 aya kadar arttığı saptanmıştır.³¹

Çalışmamızda, gastrik sıvıya sadece 1 hafta maruz kalınmış olması nedeniyle, östaki borusundaki erken döneme ait değişiklikler izlenmiştir. Sıçanların östakilerinin nazofarengiyal ve timpanik orifisleri ve sağ/sol kulakları goblet hücresi sayısı açısından kıyaslandığında, gruplar arasında herhangi bir fark saptanmamıştır (Resim 2).

Submukozal yangı hücresi infiltrasyonu, HCL gruplarında (Grup 2 ve 3) kontrol grubunda (Grup 1) olduğundan istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Fakat Grup 2 ile 3 arasında herhangi bir fark saptanmamıştır (Tablo 2). Bu durum, HCL ve pepsin uygulamasının submukozal yangı hücresi infiltrasyonunu artırdığını ve yapay tükürüğün bunun üzerinde iyileştirici bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Submukozal bez hasarı Grup 2'de Grup 1 ve 3'te olduğundan anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Fakat Grup 1 ile 3 arasında herhangi bir fark saptanmamıştır (Tablo 2). Bu durum, HCL ve pepsin uygulamasının submukozal bez hasarını artırdığını, fakat yapay tükürüğün bunun üzerinde iyileştirici, yani bez hasarını azaltıcı etkisi olduğunu göstermektedir. Ayrıca, gruplar arasında sol kulaklar için yapılan karşılaştırmada, yapay tükürük grubunda kontrol grubuna göre bez hasarının daha az olması, yapay tükürüğün, kserostominin neden olduğu bez hasarını da azalttığını ortaya koymaktadır (Tablo 5).

Caye Thomasen ve Mirko Tos'un daha sonraki yıllarda akut otitte bakteri türlerine göre östakideki bez dokusu değişiklikleri üzerine yaptıkları çalışmalarında, submukozal bezlerde 4. günde hacim artışının başladığı ve 16. günde pik yaptığı, daha sonraki dönemde bir miktar normale dönüş olmasına karşın hipertrofinin 3. aya kadar devam ettiği tespit edilmiştir.³¹ Bu artışta primer olarak bezlerin müköz komponentinin hipertrofinin etkili ol-

duğu ifade edilmektedir. Bu çalışmada, akut otit sonucunda östakinin aşırı düzeyde artmış olan salgı kapasitesinin, östaki fonksiyonunu bozarak orta kulak hastalığını kötüleştirdiği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda, submukozal bez hipertrofisi Grup 1 ve 2 ile kıyaslandığında Grup 3'te istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha az bulunmuştur. Fakat Grup 1 ile 2 arasında bir fark saptanmamıştır (Tablo 2). Bu durum, HCL-pepsin uygulamasının submukozal bez hipertrofisi üzerinde bir etkisi olmadığını, fakat yapay tükürüğün iyileştirici bir etkisinin olduğunu ve dolayısıyla da çalışmamızda hipertrofiye neden olan temel faktörün kserostomi olduğunu göstermektedir.

Grupların kendi içinde sağ ve sol kulaklar arasında kıyaslama yapıldığında, sol kulaklarda Grup 1'de submukozal yangı hücresi infiltrasyonu, bez hasarı ve bez hipertrofisi parametrelerinde, Grup 2'de bez hipertrofisi parametresinde ve Grup 3'te bez hipertrofisi ve bez hasarı parametrelerinde sağ kulaklara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede bir yükseklik saptanmış olması (Tablo 3), iki kulak arasındaki farkta polietilen tüpün sol nazal kaviteye yerleştirilmiş olmasının etkili olabileceğini düşündürmüştür. Ancak diğer parametrelerin her iki kulakta yakın düzeyde saptanması, Sudhoff'un 'bir kulağa ulaşan mide içeriği genellikle diğer kulağa da ulaşmaktadır' hipotezini doğrulamaktadır.³² Sudhoff çalışmasında ayrıca larinksinde gastrik reflü saptadığı deneklerin tümünün östaki ve timpanik kavitesinde de asit saptamıştır.³²

Yutkunma fonksiyonunu yerine getirebilen uyanık (anestezi almamış) deneklerle yapılan çalışmamızda, gruplar içinde nazofarengiyal ve timpanik orifis bölgeleri arasında submukozal yangı hücresi düzeyi açısından yapılan karşılaştırmalarda, genel olarak timpanik ostium düzeyinde yangının daha yoğun olduğu, ancak, sadece yapay tükürük verilen grupta bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 5). Bu durum yorumlandığında, verilen HCL ve pepsinin timpanik orifis düzeyine ulaştığı, fakat yapay tükürüğün bu bölgeye ulaşmaması nedeniyle böyle bir farkın oluştuğu sonucuna varılmıştır.

Timpanik orifisin nazofaringiyal orifis kadar yapay gastrik sıvıdan etkilenmesi, şu şekilde açıklanmaktadır; östaki normalde orta kulağı nazofaringiyal içeriğe karşı korumak amacıyla çoğunlukla kapalı kalmakta, sadece yutkunma esnasında açılmaktadır. Wittenborg ve Neuhauser normal fizyolojik koşullarda yutkunma esnasında nazofarinkteki sıvının minimal bir pozitif basınç varlığında nazofaringiyal orifisten girerek timpanik kaviteye kadar ulaştığını radyolojik olarak göstermişlerdir.³³ Bu çalışma, östakinin nazofaringiyal orifisinin yanı sıra timpanik orifis bölgesinin de gastrik reflüye maruz kalma mekanizmasını aydınlatmaktadır. Yazıcı ve ark.nın nazofaringiyal orifis düzeyinde daha belirgin polimorfonükleer ve lenfosit infiltrasyonu saptamaları, çalışmamızı onlarınkinden ayıran nokta olmuştur.²² Yangıya ilişkin bu bulgu, Caye-Thomassen ve Mirko Tos'un akut otitten sonra östakide meydana gelen histolojik değişikliklere ilişkin çalışmalarının bulguları ile uyumludur.²⁸

Bizim çalışmamızda; aynı kulakta N ve T bölgeleri için karşılaştırıldığında Grup1'de bütün parametrelerin, N bölgesinde T bölgesine göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik sergilemesi (Tablo 4), östakinin timpanik orifisinin kserostomiden daha az etkilendiğini göstermektedir. Grup 2'de T bölgesinde bez hasarının daha az, fakat bunun dışındaki bütün parametrelerin N bölgesi kadar etkilenmiş olması HCl/Pepsin'in ya da mide sıvısının timpanik orifise kadar ulaşabildiğini düşündürmektedir. Grup 3'te bez hipertrofisi ve bez hasarının T bölgesinde daha az olması, tükürüğün, N bölgesinde bez hipertrofisi üzerinde iyileştirici etkisi olduğunu, fakat tükürüğün timpanik orifis seviyesine kadar ulaşamadığını düşündürmektedir.

N-T bölge ayrımı ve sağ-sol kulak ayrımı yapmaksızın bütüncül olarak gruplar karşılaştırıldığında, bağ dokusu artışı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 2). Bu durum, HCl ve pepsin uygulamasının ve yapay tükürüğün bağ dokusu artışına herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

David White ve ark., bir hafta boyunca gastrik reflüye maruz bırakılan sıçanlarda östaki tüpünde işlev bozukluğu olduğunu tespit etmişlerdir.⁵ Bu çalışmada yazarlar, en belirgin olarak yutkunma ile orta kulaktaki negatif basıncın yenilmesine yönelik olarak uygulanan aktif klirens negatif basınç testinde (ventilasyon testi) ve mukosilier klirens testinde bozukluk saptamışlardır. Çalışmamızda, östakideki histolojik değişikliklere ilişkin olarak elde edilen bulgular ışığında, 1 hafta boyunca düzenli olarak nazofaringiyal HCl ve pepsine maruz bırakılan sıçanlarda, yangısal zincire sekonder olarak östaki disfonksiyonu gelişebileceği düşünülebilir.

SONUÇ

Bu çalışma, deneysel kserostomili sıçanlarda HCl ve pepsin uygulamasının erken dönemde submukozal bez hasarını arttırdığını, ayrıca yapay tükürüğün, sıçanlardaki östaki tüpünü HCl ve pepsinin etkileri olan bez hipertrofisi ve özellikle paratubal bez hasarına karşı koruduğunu, ancak bağ dokusu artışı ve submukozal yangı hücresi infiltrasyonu üzerinde olumlu etkisi olmadığını ortaya koymuştur. Ayrıca, nazofaringiyal tüp ile verilen HCl ve pepsin timpanik orifis düzeyine ulaşıyor, fakat yapay tükürük buraya ulaşamıyor olabilir. Bunun net olarak kanıtlanması, ileri çalışmaların konusu olmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Kinoshita M, Kume E, Igarashi S, Saito N, Narita H. Role of salivary mucin in the protection of rat esophageal mucosa from acid and pepsin-induced injury. *Am J Physiol* 1999;277(4 Pt 1):G796-800.
2. Lindskog S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther* 1997;74(1):1-20.
3. Shaker R. Gastroesophageal reflux disease: beyond mucosal injury. *J Clin Gastroenterol* 2007;41(Suppl 2):S160-2.
4. Yılmaz Ö, Kasırga E, Yüksel H. [Gastroesophageal reflux disease during childhood]. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 2006;15(2):66-72.
5. White DR, Heavner SB, Hardy SM, Prazma J. Gastroesophageal reflux and eustachian tube dysfunction in an animal model. *Laryngoscope* 2002;112(6):955-61.
6. Serra A, Cocuzza S, Poli G, La Mantia I, Messina A, Pavone P. Otologic findings in children with gastroesophageal reflux. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007;71(11):1693-7.
7. Paradise JL. Otitis media in infants and children. *Pediatrics* 1980;65(5):917-43.

8. Bluestone CD, Klein JO. Otitis media, atelectasis and eustachian tube dysfunction. In: Bluestone CD, Stool SE, Kenna MA, eds. *Pediatric Otolaryngology*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996. p.388-90.
9. Lieu JE, Muthappan PG, Uppaluri R. Association of reflux with otitis media in children. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;133(3):357-61.
10. Sone M, Yamamuro Y, Hayashi H, Yanagi E, Niwa Y, Nakashima T. Prediction of gastroesophageal reflux in otitis media with effusion in adults. *Acta Otolaryngol* 2007;127(5):470-3.
11. Sade J. Middle ear mucosa. *Arch Oto-Laryngologica* 1966;84(2):137-43.
12. Cheyne VD. A description of the salivary glands of the rat and a procedure for their extirpation 1,2. *J Dent Res* 1939;18(5):457-68.
13. Young YH, Hsieh T. Eustachian tube dysfunction in patients with nasopharyngeal carcinoma, pre- and post-irradiation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1992;249(4):206-8.
14. Başak S, Metin KK, Erpek G, Nar H. [Nasal cavity and nasopharyngeal pathologies in otitis media with effusion in the adult]. *K.B.B ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi* 1999; 7(1): 1-5.
15. Hsu MM, Young YH, Lin KL. Eustachian tube function of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104(6):453-5.
16. Fox PC, van der Ven PF, Sonies BC, Weiffenbach JM, Baum BJ. Xerostomia: evaluation of a symptom with increasing significance. *J Am Dent Assoc* 1985;110(4):519-25.
17. Dawes C. Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. *J Dent Res* 1987;66 Spec No:648-53.
18. Tasker A, Dettmar PW, Panetti M, Koufman JA, P Birchall J, Pearson JP. Is gastric reflux a cause of otitis media with effusion in children? *Laryngoscope* 2002;112(11):1930-4.
19. Crapko M, Kerschner JE, Syring M, Johnston N. Role of extra-esophageal reflux in chronic otitis media with effusion. *Laryngoscope* 2007;117(8):1419-23.
20. Tasker A, Dettmar PW, Panetti M, Koufman JA, Birchall JP, Pearson JP. Reflux of gastric juice and glue ear in children. *Lancet* 2002; 359(9305):493.
21. He Z, O'Reilly RC, Bolling L, Soundar S, Shah M, Cook S, et al. Detection of gastric pepsin in middle ear fluid of children with otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;137(1):59-64.
22. Yazici ZM, Sari M, Uneri C, Midi A, Tugtepe H. Histologic changes in eustachian tube mucosa of rats after exposure to gastric reflux. *Laryngoscope* 2008;118(5):849-53.
23. Heavner SB, Hardy SM, White DR, McQueen CT, Prazma J, Pillsbury HC 3rd. Function of the eustachian tube after weekly exposure to pepsin/hydrochloric acid. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;125(3):123-9.
24. Tos M, Bak-Pedersen K. Goblet cell population in the normal middle ear and Eustachian tube of children and adults. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1976;85(2 Suppl 25 Pt 2):44-50.
25. Albiin N, Hellström S, Salén B, Stenfors LE, Söderberg O. The anatomy of the eustachian tube in the rat: a macro- and microscopical study. *Anat Rec* 1983;207(3):513-21.
26. Lee IW, Goh EK, Roh HJ, Lee CH, Chung BJ, Chon KM. Histologic changes in the eustachian tube mucosa of rats after short-term exposure to cigarette smoke. *Otol Neurotol* 2006; 27(3):433-40.
27. Matsune S, Sando I, Takahashi H. Distributions of eustachian tube goblet cells and glands in children with and without otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992;101(9):750-4.
28. Cayé-Thomasen P, Tos M. Eustachian tube goblet cell density during and after acute otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*: a morphometric analysis. *Otol Neurotol* 2003; 24(3):365-70.
29. Skoner DP. Complications of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(6 Pt 2): S605-9.
30. Rhee CK, Jang YJ, Jeong PS. The effects of leukotriene and its inhibitor on the mucociliary clearance of the eustachian tube in guinea pig. In: Thomsen J, Tos M, Balle V, eds. *Otitis Media Today*. 1st ed. Copenhagen: Kugler Publications; 1999. p.199-203.
31. Cayé-Thomasen P, Tos M. Eustachian tube gland tissue changes are related to bacterial species in acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2004;68(1):101-10.
32. Sudhoff H, Bückner R, Groll C, Shagdarsuren S, Dazert S, Schreiber S. Tracing of gastric reflux into the middle ear in a mongolian gerbil model. *Otol Neurotol* 2007;28(1):124-8.
33. Wittenburg MH, Neuhauser EB. Simple roentgeno-graphic demonstration of eustachian tubes and abnormalities. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1963;89:1194-200.