

# Ratlarda Topikal Dekspantenolün Travmatik Kulak Zarı Perforasyonunda Miringoskleroz Üzerine Etkisi

## Effect of Topical Dexpanthenol on Myringosclerosis of Traumatic Tympanic Membrane Perforation

İşıl ÖZ<sup>a</sup>,  
Fatma HELVACIOĞLU<sup>b</sup>,  
Samet KOCA<sup>a</sup>,  
Seda TÜRKÖĞLU BABAKURBAN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Kulak Burun Boğaz Hastalıkları AD,  
<sup>b</sup>Histoloji ve Embriyoloji AD,  
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Ankara, TÜRKİYE

Received: 27.09.2018  
Received in revised form: 11.12.2018  
Accepted: 12.12.2018  
Available online: 28.12.2018

### Correspondence:

İşıl ÖZ  
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Kulak Burun Boğaz Hastalıkları AD,  
Ankara,  
TÜRKİYE/TURKEY  
isilaydgn@yahoo.com

Bu çalışma, 40. Türk Ulusal Kulak Burun  
Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi  
(7-11 Kasım 2018, Antalya)'nde  
poster olarak sunulmuştur.

**ÖZET Amaç:** Sıçanlarda travmatik kulak zarı perforasyonu oluşturarak, topikal dekspantenolün iyileşme üzerine etkisinin mikroskopik ve histolojik olarak incelenmesidir. **Gereç ve Yöntemler:** Yirmi dört erişkin, erkek, Spraeque-Dawley ırkı rat, eşit şekilde dört gruba ayrılmıştır. Grup 1; işlem yapılmamış, sadece kulak zarı incelenmiştir. Diğer üç grubun kulak zarında 0,8 mm perforasyon oluşturulmuştur. Grup 2; sadece perforasyon işlemi uygulanmış, Grup 3; serum fizyolojik damlatılmış (sham grubu), ve Grup 4'e; topikal 500 mg dekspantenol sıvı formu, perforasyondan hemen sonra, 24, 48, 72 ve 120. saatlerde uygulanmıştır. On beşinci günde anestezi altında, otomikroskopik inceleme yapılarak her iki zarıda kapanma, kalsifikasyon oluşumu ve histolojik değişiklikler değerlendirilmiştir. **Bulgular:** Grup 4'te diğer gruplara göre kalsifikasyon ve perforasyon gözlenmemiş ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Histolojik bulgularda, tüm gruplarda zar bağ dokularında normal zara göre kalınlaşma, dekspantenol grubunda diğer gruplara göre dejeneratif özellik gösteren fibroblastlar, kollajen lif dağılımında düzensizlikler saptanmıştır. **Sonuç:** Bu bulgular doğrultusunda, topikal dekspantenolün travmatik zar perforasyon kapanması ve miringosklerozun önlenmesinde etkili bir tedavi yöntemi olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kulak zarı perforasyonu; dekspantenol; rat; miringoskleroz

**ABSTRACT Objective:** The objective of this study is to investigate the healing effects of topical dexpanthenol on traumatic tympanic membrane perforation in rats through observations of microscopy examination and histological changes. **Material and Methods:** 24 male Spraque-Dawley rats divided into 4 groups. Group 1; without treatment, only the tympanic membrane examined. The other three groups tympanic membrane were perforated with a 0.8 mm perforator, Group 2; no topical agent was applied, only perforated, Group 3; treated with saline solution (sham group) and Group 4; treated with topical 500 mg dexpanthenol in liquid form. Saline solution and dexpanthenol applied at after perforation, 24, 48, 72, and 120 hours after the myringotomy. Otomicroscopic examination under anesthesia was performed on the fifteenth day to check the status of the myringotomy patency on each side. The healing, calcification and of tympanic membrane perforations was evaluated. **Results:** In Group 4, all the membranes were closed without calcification. Histological examination is thickening in the membrane connective tissues compared to normal was observed in all groups. Degenerative fibroblasts and irregularities in collagen fiber distribution were detected in the dexspanthenol group according to other groups. **Conclusion:** In the direction of these findings, traumatic membrane perforation in the rat model is thought to be an effective treatment modality in the development of topical dexpanthenol perforation closure and myringosclerosis.

**Keywords:** Tympanic membrane perforation; dexpanthenol; rat; myringosclerosis

Kulak zarı (KZ), insanlarda olduğu gibi ratlarda da, lateralden mediyale doğru üç tabakadan oluşmaktadır. Bunlar; keratinize strafiye skuamöz epitelten oluşan kutanöz tabaka, lateralde radyal, mediyalde sirküler seyreden liflerin yer aldığı fibröz tabaka ve orta kulak mukozasının devamı olan basit kolumnar epitel ile döşeli mukozal tabakadır.<sup>1,2</sup> KZ perforasyonu, insanlarda sık görülen klinik bir problemdir. Travma, akut otitis media ve miringotomi sonrası meydana gelen akut KZ perforasyonlarının büyük bir kısmı kendiliğinden kapanır iken, kronik perforasyonlar sıklıkla

cerrahi tedavi gerektirmektedir. KZ perforasyonu sonucunda iletim tipi işitme kaybı, sekonder enfeksiyon, skuamöz epitel kisti veya kolesteatoma formasyonu gibi komplikasyonlar gelişebilmektedir. Bu nedenle çeşitli materyaller ve teknikler KZ iyileşmesinde denenmiştir.<sup>3-6</sup>

Miringoskleroz, KZ'nin lamina propriasındaki kollojen yapının hiyalin dejenerasyonu ve kalsifikasyonu ile karakterize bir patoloji olup, efüzyonlu otitis medianın tedavisinde miringotomi yapılması ya da ventilasyon tüpü uygulaması sonrasında ortaya çıkabilmektedir.<sup>7</sup> Miringotomi sonrası orta kulakta oksijen konsantrasyonunun dış ortam seviyesine ulaşması ile hiperoksi meydana gelerek, serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşumunu tetiklemektedir. Oluşan SOR'nin ise doku hasarına yol açtığı, fibröz ve kalsifikasyon ile seyreden iyileşme süreci sonunda da miringoskleroz ile sonuçlandığı gösterilmiştir.<sup>7-9</sup>

Dekspantenol; pantotenik asitin alkol formu olup, vücutta pantotenik asite dönüşmektedir. Pantotenik asit koenzim A'nın yapısında yer alan bir moleküldür. Koenzim A, granüositlerde miyeloperoksidaz salınımını azaltarak SOR oluşumunu engellerek ve antiinflamatuvar etki göstererek mitotik aktiviteyi artırmaktadır. Ayrıca, pantotenik asit ve türevleri, hücre içinde glutatyon ve adozin-5-trifosfat sentezinde artış meydana getirmektedir. Bu süreçler oksidatif strese karşı tamir sistemlerinde ve inflamatuvar yanıtta önemli bir rol oynamaktadır.<sup>10</sup> Dekspantenolün yara iyileşmesi ve epitelizasyonu üzerindeki pozitif etkisi bilinmektedir.<sup>11</sup>

Bu çalışmada, rat KZ'lerinde, miringotomi yapılarak oluşturulan perforasyonda, bir epitelizan madde olan dekspantenolün sıvı formu ile iyileşme sürecinin klinik ve histolojik olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### DENEKLER

Çalışmaya toplam 24 adet, ortalama 300 g ağırlığında, sağlıklı erkek cinsiyette Sprague-Dawley rat dâhil edilmiştir. Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmış (DA17/07) ve Başkent Üniversitesi Araştırma fonunca desteklenmiştir.

Ratlar; 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta, 25 °C sıcaklıkta, serbest yemek ve su alabildikleri ve arka plan gürültü seviyesinin 50 dB'in altında olduğu bir ortamda barındırılmıştır.

### CERRAHİ PROSEDÜR

İşlem öncesi sodyum tiopental (30 mg/kg, intraperitoneal) ve ketamin hidroklorid (20 mg/kg, intramusküler) ile anestezi sağlanmıştır. Otomikroskop ile KZ incelenmiştir. Dış kulak yolundaki debris ve buşonlar temizlenmiştir. Zarı perforasyon ve dış kulak yolunda enfeksiyon gözlenen ratlar çalışma dışı bırakılmıştır. Normal KZ'leri olan 24 adet rat çalışmaya dâhil edilmiştir. Her bir grupta altı hayvan olmak üzere, rastgele toplam dört grup oluşturulmuştur. Grup 2, 3 ve 4'e steril pik kullanarak arka kadrana perforasyon yapılmıştır (0,8 mm çapında). Gruplar;

1. Grup (kontrol grubu); hiçbir işlem yapılmadan sadece normal KZ incelenen grup,
2. Grup: sadece miringotomi uygulanan,
3. Grup (sham grup); dış kulak yoluna sığacak boyutlarda, zarnın üzerine degecek şekilde sponjel konularak 50 µl (bir damla) serum fizyolojik damlatılan,
4. Grup (dekspantenol); dış kulak yoluna sponjel konularak aynı miktarda 500 mg dekspantenol (Bephanthene ampule®; Bayer AG, Leverkusen, Almanya) likid formu damlatılan gruptur.

Perforasyon sonrası hemen 24, 48, 72, 120. saatte olmak üzere toplam beş kez, grup 3 ve 4'e damlalar uygulanmıştır. Tüm hayvanlara deneyin 15. gününde yüksek doz tiyopental sodyum ile ötanazi yapılmıştır. Otomikroskopik değerlendirme tamamlandıktan sonra bullalar çıkarılmıştır. Pik yardımı ile anulustan çıkarılan zar 0,1M fosfat tamponlu %2,5'lik glüteraldehitte (pH 7,4) iki saat saptanmıştır. Tespit süresi bitiminde tampon ile üç kez yıkanan dokular bir saat %1'lik osmiyum tetraoksit ile etkin bırakılarak post fiksasyonları yapılmıştır. Süre bitiminde derceli alkol serilerinden geçirilen dokuların dehidrate olmaları sağlanmıştır. Son olarak, propilen oksite etkin bırakılan dokular Araldit CY212 kit ile hazırlanan gömme materyaline gömülerek bloklar hazırlanmıştır. Beş yüz altmış C'lık etüvde 48 saat süreyle polimerize edilen bloklardan yarı-ince kesitler (1500

nm) alınarak toluidin mavisi (TM) ile boyanmıştır. Leica DM 3000 görüntülü analiz sisteminde (Leica DFC 500) ışık mikroskopta incelenmiştir.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 17.0; SSPS Inc, Chicago, IL, ABD) bilgisayar programına girildi ve analiz edildi. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanıldı. p değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### OTOMİKROSKOBİK BULGULAR

On beşinci günde otomikroskopik bakıda, Grup 2'de toplam 12 (%100) KZ'nin kapandığı, fakat 7 (%58,3) zarda kalsifikasyon gözleendiği, grup 3'te 2 (%16,6) zarda perforasyonun kapanmadığı ve 6 (%50) zarda kalsifikasyon gözleendiği, grup 4'te ise tüm zarların (%100) kalsifikasyon oluşmaksızın kapandığı saptandı (Şekil 1). Grup 4'te Grup 2 ve 3'e göre miringoskleroz oluşumunda anlamlı farklılık gözleendi (sırası ile  $p=0,000$ ,  $p=0,003$ ).

### HİSTOLOJİK BULGULAR

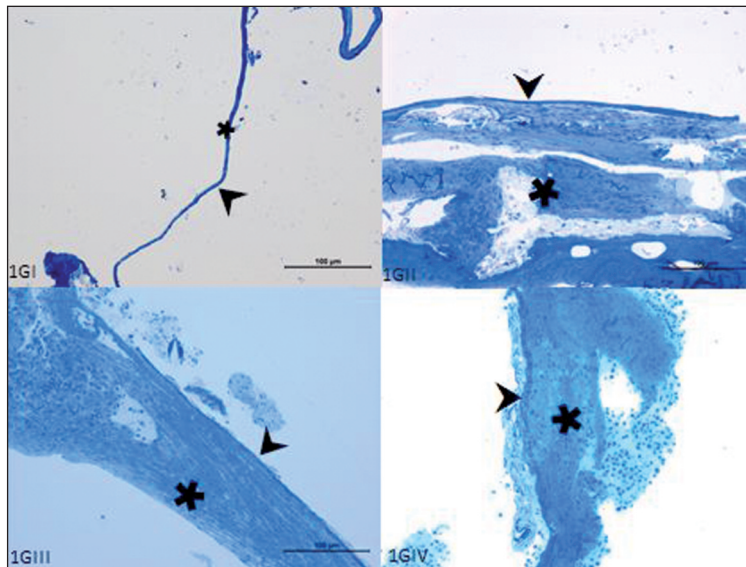
**TMx100:** Sağlıklı KZ kalınlığının (Grup 1) diğer gruplara göre daha ince olduğu görüldü (Resim 1).

	Perforasyon	Miringoskleroz	P değeri
Grup 2	0	7	0.724
Grup 3 (Sham Grubu)	2	6	
Grup 4 (Dekspanthenol grubu)	0	0	0.003
			0.000

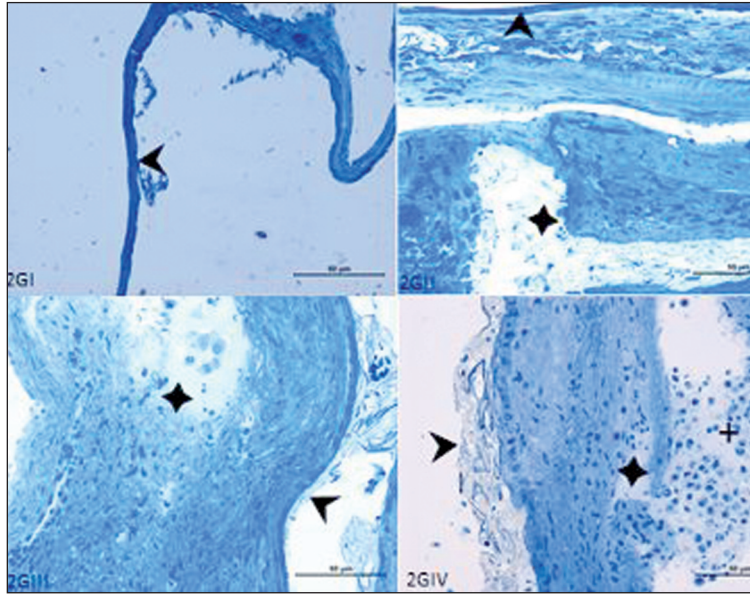
ŞEKİL 1: Tedavi grupları arasında perforasyon ve miringoskleroz sayıları.

**TMx400 (Resim 2 I-IV):** Grup 2'de çok katlı yassı epitel örtünün oldukça ince olduğu, KZ yara yüzeyinin kapandığı, ancak bağ dokusunda açılmalar ile birlikte kollajen ve elastik liflerin dağılımının bölgesel farklılık gösterdiği ayırt edildi (Resim 2GII). Grup 3'te kollajen liflerin Grup 2'ye göre daha düzenli yerleşim gösterdiği, ancak bazı alanlarda hücrelerin yoğunlaştığı izlendi (Resim 2GIII). Grup 4'te çok katlı yassı epitelin üzerindeki keratin tabakanın diğer gruplara göre belirgin olduğu görüldü (Resim 2 GIV).

En büyük büyütme (Resim 3GI-IV) Grup 2'de bağ dokusunda bazı alanların kan damarlarından zengin olduğu ve kollajen liflerin birbirine paralel yerleştiği görülürken, bazı alanlarda kollajen liflerin her yöne uzandığı izlendi. Fibroblastların sitoplazmik hatlarının ayırt edilebildiği saptandı (Resim 3GII). Grup 3'te çok katlı yassı epitel ve



RESİM 1: Timpanik membran ►; çok katlı yassı epitel yüzü; \*; bağ dokusu. 1GI: Normal kulak zarı, 1GII: Miringotomi grubu, 1GIII, Miringotomi+SF, 1GIV; Miringotomi +DX grubu (Toluidin mavisi x100).



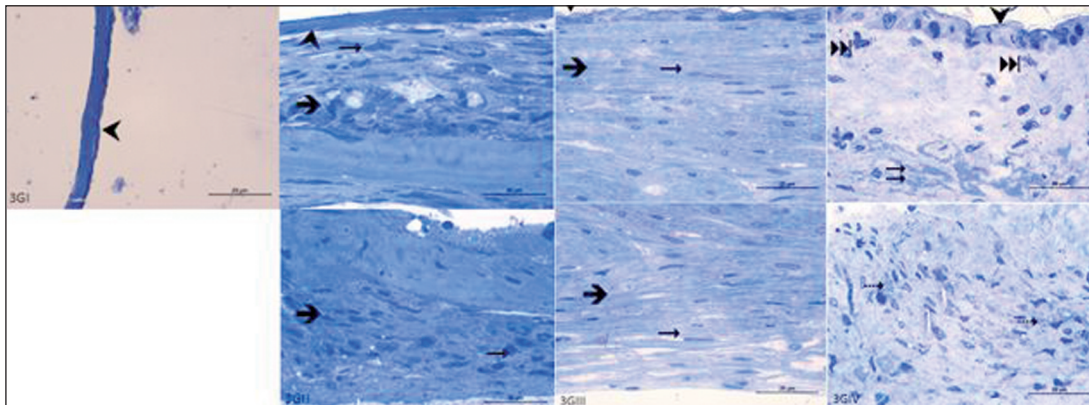
**RESİM 2:** Timpanik membran ➤; çok katlı yassı epitel yüzü; ◆; bağ dokusu açılmalar, +: polimorfonükleer hücreler. 2GI: Normal kulak zarı, 2GII: Miringotomi grubu, 2GIII, Miringotomi+SF, 2GIV: Miringotomi+DX grubu (Toluidin mavisi x400).

ince keratin tabakası görüldü. Bağ dokusundaki kollajen liflerin diğer tüm gruplara göre oldukça düzenli dağılım gösterdiği gözlemlendi. Kollajen lifler arasında paralel yerleşimli ökromatik çekirdekleri ile fibroblastlar izlendi. KZ'nin diğer gruplara göre oldukça kalın olduğu saptandı (Resim 3GIII). Grup 4'te çok katlı yassı epitelin bazalindeki hücreler yuvarlak ve ökromatik çekirdekleri ile ayırtılmakta idi. KZ dış kulak yoluna bakan yüzde keratin tabakasının diğer gruplara göre belirgin olduğu görüldü. Bu grupta epitelin hemen altındaki bağ dokusu bölümünde bazı alanlarda mast hücreleri

izlendi. Membran kalınlığının Grup 2'ye göre göreceli olarak ince olduğu belirlendi. Diğer gruplardan farklı olarak vakuoler sitoplazmalı fibroblast hücreleri ayırt edildi (Resim 3GIV).

## TARTIŞMA

Çalışmamızda, ratlarda deneysel olarak oluşturulan travmatik KZ perforasyonu sonrasında dekspantenol uygulamasının, kontrol gruplarına göre iyileşme sürecinde perforasyon kapanmasında etkin olduğu ve sklerotik plak gelişiminin gözlenmediği saptanmıştır.



**RESİM 3:** Timpanik membran ➤; çok katlı yassı epitel yüzü ➔: kollajen lifler, →: Fibroblast hücre çekirdeği, ►►: mast hücresi, →→: Vakuoler sitoplazmalı fibroblast hücreleri ⇨; yoğun kollajen lif kümeleri. 3GI: Normal kulak zarı, 3GII: Miringotomi grubu, 3GIII, Miringotomi+SF, 3GIV: Miringotomi+DX grubu (Toluidin mavisi x1000).



KZ perforasyonu sonrasında iyileşme süreci, epitelyal proliferasyon, migrasyon, fibroblast proliferasyonu ve neovaskülarizasyonu gibi kompleks bir doku organizasyonu meydana gelmektedir.<sup>3-6</sup> Perforasyon iyileşmesinde öncelikle epitel tabaka mitotik aktivite artış ile kapanmakta, sonrasında lamina propria tabakası rejenerasyonu gerçekleşmektedir.<sup>12,13</sup> Literatürde, perforasyon iyileşmesinde deneysel olarak birçok topikal etken denemiştir. Özellikle hayvan modellerinde EGF (8), dönüştürücü büyüme faktörü-beta 1 (5) ve bFGF (3) üzerine yapılmış çalışmalarda, kontrol gruplarına göre neovaskülarizasyon, fibroblast proliferasyonu ve matriks kalınlığında anlamlı düzeyde farklılıklar saptanmıştır.

Dekspantenol; özellikle epidermal yara, yanıklar ve çeşitli cilt problemleri (kaşıntı, fissür, kızarıklık gibi) gibi dermatolojik hastalıklarda yara iyileşmesi ve epitelizasyonda etkin bir maddedir. Dekspantenolün aktif formu olan pantotenik asit, epitel üzerindeki etkinin ana maddesidir.<sup>11</sup> İn vivo ve in vitro çalışmalarda, dekspantenolün fibroblast proliferasyonunu aktive ederek yara iyileşmesinde rol oynadığı gösterilmiştir.<sup>6,11</sup>

KZ akut perforasyonundan sonra iyileşme süresi 7-10. günde başlamakta ve 14. günde tamamlanmaktadır.<sup>1</sup> Literatürde yapılmış çalışmalarda, bu sürelerde topikal farklı maddelerde bir veya iki gün iyileşme süresi erken bulunmuş olsa da çalışmamızda perforasyon sonrasında sponjeller konularak damlalar damlatıldığından, ratların anestezi ile tekrar tekrar sponjellerin çıkarılması zorluğu ve olu-

şabilecek travma nedeni ile kapanma süresi değerlendirilmemiştir.<sup>14,15</sup> İyileşme süresinde normale yakın bir dokunun oluşumu amaçlanmış ve sonuçlar doğrultusunda dekspantenol grubunda kontrol gruplarına göre perforasyonların kapanması ve sklerotik plakların oluşmaması maddenin etkin olabileceğini göstermektedir.

## SONUÇ

Çalışmamızda, dekspantenolün kalsifikasyon oluşturmadığı, perforasyon kapanmasını sağladığı ve perforasyon sonrasındaki iyileşme sürecinde tüm gruplarda KZ'lerde, özellikle bağ dokusunda belirgin kalınlaşma olduğu saptanmıştır. Serum fizyolojik uygulanan grupta kollajen liflerin diğer gruplara göre daha düzenli yerleşim gösterdiği izlenirse de membranın oldukça kalın olduğu görülmüştür. Bu grupta kapanmayan iki perforasyonun da membran kalınlığında belirgin artış olması nedeni ile olabileceği düşünülmektedir. Dekspantenol uygulanan grupta dejeneratif özellik gösteren fibroblastlar, kollajen lif dağılımında düzensizlikler, bağ dokusu tabakasının yine normal zar örneklerindeki yapısal düzeninden uzak olduğu izlenmiştir. Ancak, rat sayısının az olması ve bu neden ile histolojik olarak istatistiksel değerlendirme yapılmamış olması, dekspantenolün orta kulak ve iç kulağa olan etkilerinin bilinmemesi çalışmamızın sınırlayıcı faktörlerini oluşturmaktadır. Daha fazla sayıda gruplar içeren prospektif çalışmalar ile bulgularımızın desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Araújo MM, Murashima AA, Alves VM, Jamur MC, Hyppolito MA. Spontaneous healing of the tympanic membrane after traumatic perforation in rats. *Braz J Otorhinolaryngol* 2014;80(4):330-8.
2. 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(1):43-7.
3. Aksoy F, Dere H, Ünal A, Özcan İ, Yardımcı S, Ergül G, et al. [Histological evaluation of basic fibroblast growth factor effect on the healing of traumatic tympanic membrane]. *Türk Otolarengoloji Arşivi* 1997;35(1-2):33-7.
4. Jhonson AP, Smallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. A two-dimensional histological study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 1990;109(5-6):406-15.
5. Kaftan H, Herzog M, Miede B, Hosemann W. Topical application of transforming growth factor-beta 1 in acute traumatic tympanic membrane perforations: an experimental study in rats. *Wound Repair Regen* 2006;14(4):453-6.
6. Mattsson C, Stiernä P, Hellström S. Treatment with dexamethasone arrests the development of myringosclerosis after myringotomy. *Am J Otol* 2000;21(6):804-8.
7. Mattsson C, Magnuson K, Hellström S. Myringosclerosis caused by increased oxygen concentration in traumatized tympanic membrane. Experimental study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104(8):625-32.
8. O'Daniel TG, Petitjean M, Jones SC, Zogg J, Martinez SA, Nolph MB, et al. Epidermal growth factor binding and action on tympanic membranes. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990;99(1):80-4.

9. Russell JD, Giles JJ. Tympanosclerosis in the rat tympanic membrane: an experimental study. *Laryngoscope* 2002;112(9):1663-6.
10. Altıntaş R, Parlakpınar H, Beytur A, Vard, N, Polat A, Sagir M, et al. Protective effect of dexpanthenol on ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. *Kidney Blood Press Res* 2012;36(1):220-30.
11. Ebner F, Heller A, Rippke F, Tausch I. Topical use of dexpanthenol in skin disorders. *Am J Clin Dermatol* 2002;3(6):427-33.
12. Santa Maria PL, Redmond SL, Atlas MD, Ghassemifar R. Histology of the healing tympanic membrane following perforation in rats. *Laryngoscope* 2010;120(10): 2061-70.
13. Stenfors LE, Carlsöö B, Salén B, Winblad B. Repair of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol* 1980;90(5-6):332-41.
14. Araujo MM, Murashima AA, Alves VM, Jamur MC, Hyppolito MA. The topical use of insulin accelerates the healing of traumatic tympanic membrane perforations. *Laryngoscope* 2016;126(1):156-62.
15. Zhang D, Huang Z, Sun P, Huang H, Zhang Y, Dai J, et al. Acceleration of healing of traumatic tympanic membrane perforation in rats by implanted collagen membrane integrated with collagen-binding basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng Part A* 2017;23(1-2):20-9.