

## Ratlarda Pars Timpani Perforasyonunda Nar Ekstratının Mast Hücre Sayısına Etkisi

Tuğrul ERTUĞRUL<sup>1</sup> Şerife TÛTÛNCÛ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ondokuz Mayıs, Samsun, Turkey

\*Sorumlu Yazar

E-mail:tugrul.ertugrul@omu.edu.tr

### Özet

Kulak zarının temel fonksiyonu ses titreşimlerini dış ortamdan alarak kulak kemikçiklerine iletmektir. Yara iyileşmesinde mast hücrelerinin sayılarının arttığı bildirilmektedir. Bu çalışmada, deneysel pars tensa perforasyonunda mast hücrelerinin sayı ve heterojenitesi incelenmiştir. Pars tensa %10 formol'de tespit edilip yıkandıktan sonra rutin histolojik doku takibi prosedürlerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Alınan kesitler toluidin blue ve alcian blue/safranin O kombine boya metodu ile boyandı. Tüm gruplarda, pars tensada mast hücreleri metakromatik, alcian blue (+) ve safranin O (+) boyandı. İyileşme sürecinde en fazla sayıda mast hücresine nar ekstratı verilmiş grupta rastlandı.

**Anahtar Kelime:** Pars tensa, perforasyon, nar ekstratı, mast hücresi.

## Effect Of Pomegranate Extract On Number Of Mast Cells In Pars Tympani Perforation In Rats

### Abstract

Main function of tympanic membrane is to take sounds vibrations from the outer air and convey them to auditory ossicles. Mast cells numbers have been reported to increase and play an important role in wound healing. The aim of this study was to assess the density and heterogeneity of mast cell in rat pars tensa tympanic membrane in experimental perforation. Pars tensa were fixed in 10% formaldehyde, then, after routine tissue follow-up, samples blocked. Cross-sections were stained with the toluidine blue and alcian blue/safranin O. In all groups pars tensa, mast cell metachromatic stained and stained as alcian blue (+) and safranin O (+). Highest amount of mast cells in pars tensa were found in given pomegranate extract in process of healing.

**Keywords:** Pars tensa, Perforation, Pomegranate extract, Mast cell.

## GİRİŞ

Temel fonksiyonu ses titreşimlerini dış ortamdan alarak kulak kemikçiklerine iletmek olan kulak zarı dış kulak yolunu orta kulak boşluğundan ayırır [1, 2]. Kulak zarının, dış kulak yolundan orta kulağa geçebilecek tahriş edici ve enfeksiyon ajanlara karşı koruyucu rol oynadığı bilinmektedir [2, 3]. Timpanik membran, pars flaccida ve pars tensa olmak üzere iki parça içerir [4, 5]. Pars tensa, dıştan içeri doğru beş katmandan oluşmaktadır. Dıştan içeri doğru bu katmanlar, keratinize epidermal katmanı, ince bağ doku katmanı, sıkı bağ doku katmanı, ince bağ doku katmanı ve tek katlı yassı epitel hücrelerinin oluşturduğu katmandır [5, 6].

Mast hücreleri, antijenlerin vücuda girebileceği dış ortamla ilişkide bulunan sistemlerde yerleşmişlerdir [7]. Bu yerleşim mast hücrelerinin savunma mekanizmasında bulunan ilk hücre grupları arasında yer almalarını sağlar [8]. Histokimyasal farklılıkları, içerdikleri mediyatörler, salgılatıcı ajanlara verdikleri yanıtlar gibi unsurlar göz önüne alındığında mast hücreleri [9], mukozal mast hücresi (MMC) ve bağdoku mast hücresi (CTMC) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır [9, 10].

Pars tensada mast hücreleri ya çok az sayıda bulunur ya da hiç bulunmaz [11]. Yapılan çalışmalarda yara bölgesinde iyileşme esnasında mast hücrelerinin sayısında artış olduğu bildirilmektedir [12].

Bu çalışmanın amacı, pars tensa perforasyonunun iyileşme sürecinde mast hücrelerinin sayı ve heterojenitesini incelemek, ayrıca nar ekstratının mast hücre sayısı üzerinde etkisi olup olmadığını araştırmaktır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada; erkek, yetişkin, dış kulak yolu ve timpanik membranları sağlam 15 rat kullanıldı. Ratlar 2 çalışma ve 1 negatif kontrol olmak üzere rastgele 3 gruba ayrıldı.

1. Negatif kontrol grubu: Hiçbir müdahale yapılmayan grup.
2. Pozitif kontrol grubu: Miringotomi yapılan fakat nar ekstratı verilmeyen grup.
3. GNE verilen grup: Miringotomi yapılan ve gavaj ile geleneksel yöntemle elde edilen nar ekstratı verilen grup.

GNE grubundaki ratlara miringotomiden 1 gün önce 100µl/gün nar ekstratı gavaj yoluyla verildi. Pozitif kontrol ve GNE gruplarındaki ratlara intraperitoneal 50 mg/kg ketamin hidroklorür ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid enjeksiyonuyla anestezi yapılarak çapı 1 mm olan koterle sağ kulak zarında 1 mm uzunluğunda miringotomi yapıldı. Negatif kontrol grubuna herhangi cerrahi işlem uygulanmadı. GNE gruplarındaki ratlara miringotomiden sonra, 24 saat ve 48 saat sonra da 100µl/gün nar ekstratı verildi. 14 günlük iyileşme periyodu sonrası tüm gruptaki ratlar sakrifiye edildi.

Timpanik membranlar %10 formol'de tespit edilip yıkandıktan sonra rutin histolojik doku takibi prosedürlerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Normal histolojik yapısını incelemek amacıyla parafin bloklardan alınan 5 µ'luk kesitlere Crossmon'ın üçlü boyama tekniği uygulandı [13].

Hazırlanan bloklardan 30µ arayla 5µ kalınlığında 10'ar adet seri kesitler alınarak toluidin blue ile boyandı. Mast hücrelerinin alt tiplerini belirlemek amacıyla alcian blue/safranin O (AB/SO) kombine boya metodu yapıldı [14].

Mast hücrelerinin sayısal dağılımını belirlemek amacıyla-

la hazırlanan seri kesitlerde hücre sayımları 100 kare oküler mikrometre ile yapıldı. Objektifin 40'lık büyütmesi ile oküler mikrometrenin 100 kare birim alanındaki mast hücreleri sayıldı. Pars tensadan alınan kesitlerde rastgele seçilen 5'er değişik bölgede hücre sayımı yapıldı. Seri kesitlerin sayılması sonucu bu rakamların aritmetik ortalaması alındı. Elde edilen tüm veriler, 1 mm<sup>2</sup>'lik birim alandaki mast hücre sayısına dönüştürüldü [15]. Gruplar arasındaki mast hücre sayılarının karşılaştırılmasında SPSS paket programı kullanılarak [16], sonuçlar minimum %5 hata payı ile değerlendirildi.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Mast hücreleri, farklı büyüklüklerde yuvarlak, oval ya da mekik şeklinde gözlemlendi. Merkezi veya ekzantrik konumda yerleşmiş olan çekirdeğin, çoğu hücrelerde granüller tarafından örtülmüş olduğu görüldü. Toluidin blue ile mast hücre granülleri ve sitoplazmasının homojen metakromatik olarak boyandığı saptandı (Şekil 1). Mast hücrelerinin pars tensada keratinize epidermal katmanı altındaki ince bağ doku ve sıkı bağ doku katmanında yerleşmiş olduğu gözlemlendi (Şekil 2). Pars tensada, pozitif kontrol grubu ve nar ekstreği verilmiş grupta mast hücrelerinin sayısının belirgin şekilde arttığı görüldü. Yapılan ışık mikroskopik incelemede en fazla mast hücre sayısına nar ekstreği verilmiş grupta en az sayıda mast hücrelerine ise negatif kontrol grubunda rastlandı.

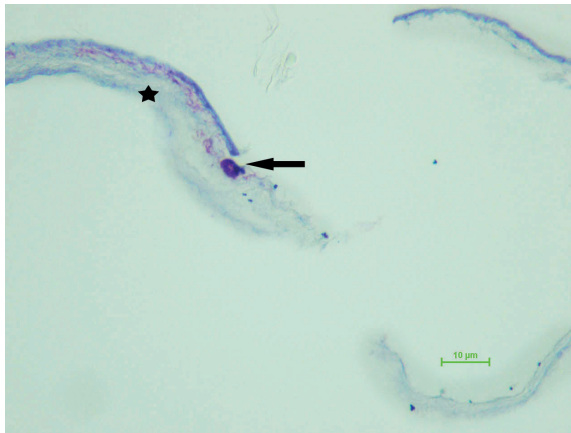
Negatif kontrol, pozitif kontrol ve nar ekstreği verilmiş grupların rastgele seçilen her bir bölgesinden 100 kare birim alanda mast hücreleri sayılıp 1 mm<sup>2</sup>'lik birim alandaki hücre sayısına dönüştürülerek tablo 1'de verildi. Mast hücre sayıları karşılaştırıldığında, mast hücrelerinin mm<sup>2</sup>'deki ortalama sayıları arasında istatistiksel olarak bir fark olduğu saptandı (P<0.001). (Tablo 1).

**Tablo 1:** Pars tensada mast hücrelerinin sayısal dağılımı (mm<sup>2</sup>).

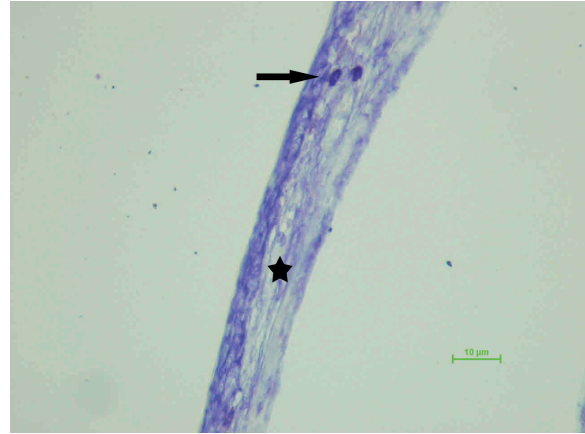
Gruplar	n	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	Minimum	Maksimum
Negatif kontrol grubu	5	0.23±0.01 <sup>a</sup>	0.20	0.28
Pozitif kontrol grubu	5	2.09±0.04 <sup>b</sup>	2.00	2.24
Nar ekstreği verilmiş grup	5	2.27±0.10 <sup>b</sup>	2.00	2.56
P		***		

\*\*\*: P<0.001

a,b: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir

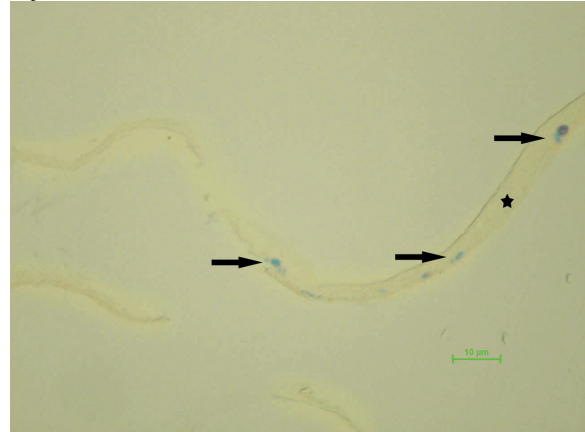


**Şekil 1.** Pozitif kontrol grubu, (yıldız) pars tensa, (ok) metakromatik mast hücresi, toluidin blue, 40x.

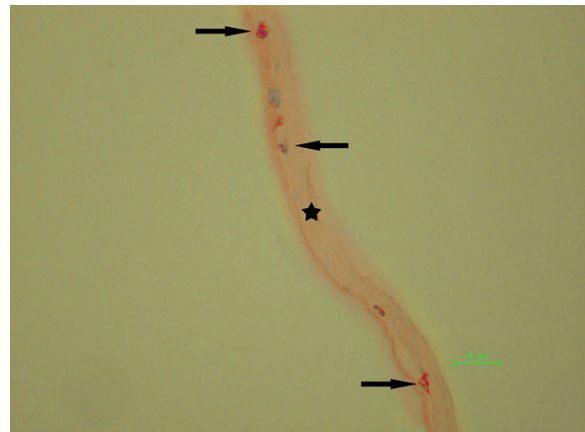


**Şekil 2.** Negatif kontrol grubu, (yıldız) pars tensa, (ok) metakromatik mast hücresi, toluidin blue, 40x.

Alcian blue/safranin O kombine boyamasında, mavi renkte AB(+) (Şekil 3) kırmızı renkte SO(+) ve kırmızı-mavi renkte AB/SO(+) (mikst) (Şekil 4) mast hücreleri gözlemlendi. Üç gruptaki pars tensa dokuları incelendiğinde sayıca en fazla SO(+) ve en az sayıda AB/SO(+) (mikst) mast hücreleri saptandı.



**Şekil 3.** Pozitif kontrol grubu, (yıldız) pars tensa, (ok) AB(+) mast hücresi, alcian blue/safranin O (AB/SO) kombine boya metodu, 20x.



**Şekil 4.** Nar ekstreği verilmiş grup, (yıldız) pars tensa, (ok) SO(+) ve AB/SO(+) mast hücreleri, alcian blue/safranin O (AB/SO) kombine boya metodu, 20x.

Çekirdeklerin merkezi veya ekzantrik konumda yerleştiği mast hücrelerinin [17], farklı büyüklüklerde yuvarlak, oval ya da mekik şekilli, toluidin blue ile belirgin şekilde metakromazik boyandığı bildirilmiştir [18]. Çalışmaya ait bulgular literatür bilgileriyle uyum göstermektedir.

Ratlarda deneysel olarak yapılmış miringotomi [19], otitis mediya gelişimi [20] ve timpanik membran perforasyonunun [21] incelendiği çalışmalarda, mast hücrelerinin pars tensanın dış tarafa bakan keratinize katmanın hemen altındaki bağ dokuda yerleşmiş olduğu gözlenmiştir. Yaptığımız çalışmada mast hücrelerinin pars tensadaki yerleşim yeri yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Kulak zarında topikal askorbik asit etkisinin incelendiği [21], akut otitis mediyanın kulak zarı perforasyonu iyileşmesi üzerinde [22] ve deneysel timpanik membran perforasyonunun [23] araştırıldığı çalışmalarda ratlarda pars tensada mast hücreleri görülmüştür. Çalışmamızda pars tensada mast hücre görülməsi daha önce yapılan çalışmalarla uyumludur.

Schmidt ve ark. lokal anestezinin rat timpanik membranı üzerine etkisini araştırdıkları [24], Hellström ve ark. hidrokortizonun timpanik membran iyileşmesi üzerine etkisini inceledikleri [25], Thomasen ve ark. otitis mediyanın perforasyonun iyileşme sürecinde pars tensaya etkisini araştırdıkları [26] çalışmalarında pars tensada mast hücrelerinde sayıca artış saptamışlardır. Deneysel olarak miringotomi ile oluşturduğumuz timpanik membran perforasyonunda, pars tensada mast hücre sayısında artış gözlemlenmemiz araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir.

Sunulan bu çalışmada, alcian blue/safranin O kombine boyamasında, kırmızı renkte SO(+), mavi renkte AB(+) ve kırmızı-mavi renkte AB/SO(+) (mikst) mast hücreleri tespit edilmiştir. Kobay kulak zarında yapılan çalışmada SO(+) mast hücreleri [27], deride mast hücrelerinin yara iyileşmesine etkisinin araştırıldığı çalışmada kırmızı renkte SO(+), mavi renkte AB(+) mast hücreleri [28] ve rat akciğerlerinde sigara dumanı etkisinin araştırıldığı çalışmada SO(+), AB(+) ve kırmızı-mavi renkte AB/SO(+) (mikst) mast hücreleri gözlemlendiği [29] bildirilmektedir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak pars tensanın iyileşme sürecinde mast hücre sayısında belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulguların, pars tensada bulunan mast hücrelerinin, boyanma özellikleri ve dağılımı üzerine kaynak oluşturabileceği ayrıca bu konuda yapılacak diğer çalışmalara katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

[1] Araújo MM, Murashima AA, Alves VM, Jamur MC, Hyppolito MA. 2014. Spontaneous healing of the tympanic membrane after traumatic perforation in rats. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 80(4): 330-8.

[2] Shen Y, Guo Y, Du C, Wilczynska M, Hellström S, Ny T. 2012. Mice deficient in urokinase-type plasminogen activator have delayed healing of tympanic membrane perforations. *PLoS One*, 7(12): 51303.

[3] Santa Maria PL, Atlas MD, Ghassemifar R. 2007. Chronic tympanic membrane perforation: a better animal model is needed. *Wound Repair and Regeneration*, 15(4): 450-8.

[4] Stenfeldt K, Johansson C, Hellström S. 2006. The collagen structure of the tympanic membrane: collagen types I, II, and III in the healthy tympanic membrane, during healing of a perforation, and during infection. *Otolaryngology – Head & Neck Surgery*, 132(3) :293-8.

[5] Santa Maria PL, Redmond SL, Atlas MD, Ghassemifar R. 2010. Histology of the healing tympanic membrane following perforation in rats. *Laryngoscope*, 120(10): 2061-70.

[6] Stenfors LE, Bloom GD, Hellström S. 1984. The tympanic membrane. *Acta oto-laryngologica*, 414: 28-30.

[7] Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. 2016. Mast cell: a multi-functional master cell. *Frontiers in Immunology*, 6, 620.

[8] Wernersson S, Pejler G. 2014. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nature Reviews Immunology*, 14(7): 478-94.

[9] Lin T, Befus AD. 2002. Mast cells in mucosal defense and pathogenesis. in: *mucosal immunity volume 1*, Ed.: J. Mestecky, M. E. Lamm, W. Strober, J. Bienstock, J. R. McGhee, L. Mayer. Elsevier Academic Press, USA. 703-710p.

[10] Enerback L. 1966. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa: 1. effects of fixation. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*, 66: 289-302.

[11] Cayé-Thomasen P, Tos M. 1996. Mast cell clusters in pars tensa membranae tympani in acute otitis media: a possible role in perforation healing. *Acta Oto-Laryngologica*, 116(6): 845-9.

[12] Wulff BC, Parent AE, Meleski MA, DiPietro LA, Schrementi ME, Wilgus TA. 2012. Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(2): 458-65.

[13] Crossmon O. 1937. A modification of mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *The Anatomical Record*, 69: 31-38.

[14] Enerback L. 1966. Mast Cells in rat gastrointestinal mucosa: 2. dye-binding and metachromatic properties. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*, 66, 303-312.

[15] Böck P. 1989. *Romeis Mikropische Technik*. Urban und Schwarzenberg, Aufl, München, Wien, Baltimore.

[16] Freld A. 2009. *Discovering statistics using SPSS*, 3rd edition, Sage, London.

[17] Ertuğrul T, Çiftçi G, Tütüncü Ş. 2017. Formaldehit maruz kalmış ratlarda böbrek dokusunda mast hücrelerinin dağılımı ve heterojenitesi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 88(2): 26-37.

[18] Özen A, Bayraktaroğlu AG, Ertuğrul T, Özcan Z, Ceylan A, Özen D. 2014. Domuz oviduktunda mast hücreleri üzerinde ışık ve elektron mikroskopik çalışmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 61, 9-14.

[19] Mattsson C, Johansson C, Hellström S. 1999. Myringosclerosis develops within 9h of myringotomy. *Otorhinolaryngol Relat Spec*, 61 (1): 31-6.

[20] Eriksson PO, Mattsson C, Hellstrom S. 2003. First forty-eight hours of developing otitis media: An experimental study. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 112, 558-66.

[21] Spratley JE, Hellström SO, Mattsson CK, Pais-Clemente M. 2001. Topical ascorbic acid reduces myringosclerosis in perforated tympanic membranes. A study in the rat. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 110 (6): 585-91.

[22] Spratley J, Hellström S, Eriksson PO, Pais-Clemente M. 2002. Myringotomy delays the tympanic membrane recovery in acute otitis media: a study in the rat model. *Laryngoscope*, 112: 1474-81.

[23] Santa Maria PL, Redmond SL, Atlas M.D, Ghassemifar R. 2010. Histology of the healing tympanic membrane following perforation in rats. *Laryngoscope*, 120 (10): 2061-70.

[24] Schmidt SH, Hellström S, Carlsöö B. 1984. Short-term effect of local anaesthetic agents on the structure of the

rat tympanic membrane. Arch Otorhinolaryngology, 240: 159-166.

[25] Spandow O, Hellström S, Schmid SH. 1990. Hydrocortisone delay of tissue repair of experimental tympanic membrane perforations. Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology, 99 (8): 647-53.

[26] Cayé-Thomasen P, Tos M. 1996. Mast cell clusters in pars tensa membranae tympani in acute otitis media: a possible role in perforation healing. Acta Oto-Laryngologica, 116(6): 845-9.

[27] Watanabe T, Kawauchi H, Fujiyoshi T, Mogi G. 1991. Distribution of mast cells in the tubotympanum of guinea pigs. Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology, 100: 407-12.

[28] Wulff BC, Parent AE, Meleski MA, DiPietro LA, Schrementi ME, Wilgus TA. 2012. Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing. Journal of Investigative Dermatology, 132(2) :458-65.

[29] Eren U, Kum S, Sandıkcı M, Kara E. 2006. Effects of long-term passive smoking on the mast cells in rat lungs. Revue de Médecine Vétérinaire, 157, 6, 319-322.