

KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE KALSİTONİN HORMONUNUN ETKİSİ

Ercan ÇETİNUS*, **Metin AKGÜMÜŞ****, **İlhan CEVER*****

Ö. Faruk ATAY****, **Sevgi BAKARİŞ*******

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, sistemik olarak verilen kalsitonin hormonunun (Salmon Calcitonin) kırık iyileşmesi üzerindeki etkisini sıçan modelinde ışık mikroskopu düzeyinde araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: 40 adet wistar albino erişkin sıçan kontrol (K) ve Kalsitonin (C) olmak üzere rastgele olarak iki gruba ayrıldı. Sıçanların tümüne ketamin anestezisi altında steril koşullarda cerrahi olarak tibia-fibula diafiz kırığı oluşturuldu. Kırıklar enjektör iğnesinin metal kısmı ile intramedüller olarak tespit edildi. Kalsitonin grubuna postoperatif 20 gün süreyle 10/MRC-Ü/kg/gün dozda cilt altı yolla salmon kalsitonin (Miacalsic Sandoz) verildi. Kontrol grubuna ise herhangi bir tedavi verilmedi. Post operatif 5, 12, 19, 26 ve 56. günlerde daha önce rastgele olarak dörderli gruplara ayrılmış olan sıçanlar öldürülerek kırık tibialara histolojik değerlendirme yapıldı.

Bulgular: Histolojik incelemede her iki grupta kırık bölgesinde 5. günde hematoma oluşumu, 12. gün sonunda fibröz kallus dokusu ve 19. günde immatür kemik haline dönüşmeye başlayan kırık dokusu gözlemlendi. Postoperatif 26. günde her iki grupta da, kırık bölgesinde belirgin osteoid doku oluşumu ve 56. Günde ise her iki grupta da makroskopik olarak normal bütünlüğü ile kesilemeyen, dekalsifikasyon ihtiyacı gösteren nonlamellar kemik trabekülleri oluşumu gözlemlendi.

Sonuç: Kırık iyileşmesi aşamaları tümüyle göz önüne alındığında kontrol ve kalsitonin grupları arasında hiçbir aşamada histolojik yönden göze çarpan bir farklılık gözlemlenmedi.

Anahtar Kelimeler: *Kırık İyileşmesi, Kalsitonin, Kallus.*

SUMMARY

EFFECTS OF THE CALCITONIN HORMONE ON FRACTURE HEALING

Objective: The goal of this study is to investigate the role of systemic calcitonin (Salmon calcitonin) application on the healing of fractures in a rat model at the light microscopic level.

Material and Method: 40 adult wistar albino rats were divided into two groups as control (K) and calcitonin (C) randomly. Surgical fractures to the diaphysis of tibia and fibula were applied to all rats under sterile conditions and ketamin anesthesia. Fractures were fixed by intramedullary application of the metal part of injector needle. Salmon calcitonin (Miacalcic Sandoz) was given to the calcitonin group subcutaneously at a dose of 10 MRC-U/kg/day for 20 days after the operation. No treatment was given to the control group. Rats, divided into quadruplicate groups in a randomized manner previously, were sacrificed in the 5th, 12th, 19th, 26th and 56th days postoperatively and fractured tibiae were evaluated histologically.

Results: In the histological evaluation of the site of fracture, hematoma formation in the 5th day, fibrous callus tissue in the 12th day, and cartilaginous callus tissue in the 19th day were observed in both groups. Osteoid tissue formation was seen in the fracture site in both groups in the 26th day after the operation. In the postoperative 56th day, nonlamellar bony callus formation which cannot be cut by regular surgical blade macroscopically and requiring decalcification in both groups were observed.

* Yrd. Doç. Dr., Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı.

** Op. Dr., S.B. Adapazarı Devlet Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği.

*** Doç. Dr., S.B. Haseki Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği Şefi.

**** Uzm. Dr., S.B. Haseki Hastanesi Patoloji Kliniği Şef Muavini.

***** Uzm. Dr., Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı.

Conclusion : When all the steps of fracture healing were revealed, no significant difference was found in any of those steps among the calcitonin and control groups histologically.

Key Words: *Fracture Healing, Calcitonin, Callus.*

GİRİŞ

Kalsitonin hormonunun en belirgin farmakolojik etkisi osteoklastlar üzerindeki direkt etkisiyle kemik rezorpsiyonunun inhibisyonudur. Bu etkisi sonucunda serumda fosfat ve kalsiyum düzeyini düşürür. Bazı araştırmacılar kalsitoninin farmakolojik dozlarının, organik kemik matriksinin mineralizasyonu üzerinde etkisinin olmadığını, hatta mineralizasyonda azalmaya yol açtığını bildirmişler¹, bazıları ise mineralizasyon üzerinde stimülatör rol oynadığını belirtmişlerdir²⁻⁵. Ayrıca bağ dokusu tamiri ve kollagen sentezi üzerinde bazı olumlu etkilerinin olabileceği iddia edilmiştir^{6,7}.

Bu çalışmalar ışığında biz de kalsitonin hormonunun kırık iyileşmesinde rolü olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi DETAM laboratuvarında yapılan bu çalışmada, 40 adet (200-250 gr) erkek wistar albino sıçan kullanıldı. Rastgele sayılar tablosu kullanılarak her sıçana bir numara verildi. Daha sonra en büyük numaralı 20 sıçan kalsitonin grubuna, kalanlar ise kontrol grubuna dahil edilerek 40 sıçan iki gruba ayrıldı. Sıçanlar deney boyunca hazır yem ve su ile beslendi. 24 derece santigrad oda sıcaklığında muhafaza edildi. Her iki grup kendi içinde rastgele olarak dörder hayvandan oluşan beş gruba ayrıldı. Tüm hayvanlara ketamin (%20 mg/kg İ.M.) anestezisi uygulandı. Hayvanların sağ arka bacak tüyleri traşlandı ve steril koşullarda sağ bacağa anterior insizyon ile girilerek tibia ve fibula orta kısmına manuel olarak transvers osteotomi uygulandı. Kırık tibia redükte edilerek 12 numara enjektör iğnesinin metal kısmı ile intramedüller tespit uygulandı. Katlar anatomik olarak kapatıldı. 20 hayvandan oluşan birinci gruba post operatif ilk günden itibaren yirmi gün süreyle cilt altı yolla 10 MRC-U (Medikal Araştırma Konsey Ünitesi)/kg./gün dozda salmon kalsitonini (Miacalcic Sandoz, Basel, Switzerland) verildi. 20 deney hayvanının oluşturduğu kontrol grubuna ise herhangi bir tedavi verilmedi. Postoperatif, 5., 12., 19. günlerde kontrol ve kalsitonin grubundan dörder hayvan, 26. günde kontrol grubunda 3 hayvan (kontrol

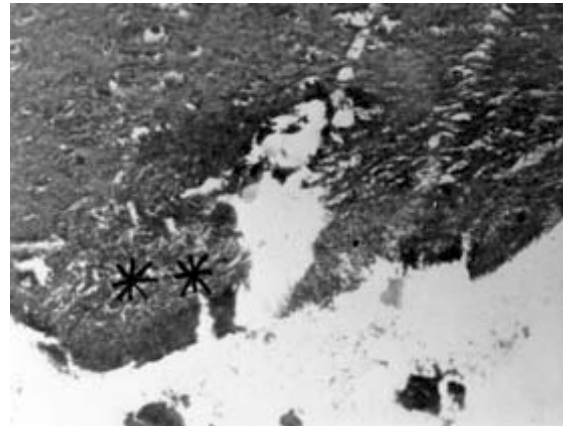
grubundaki hayvanlardan bir tanesi 20. günde öldü), kalsitonin grubunda kalan 4 hayvan, 56. günde ise kontrol grubunda kalan 3 hayvan (kontrol grubunda 30. günde bir hayvan öldü) ve kalsitonin grubunda kalan 4 hayvan yüksek doz eter anestezisi uygulanarak öldürüldü. Opere edilmiş arka sağ alt ekstremitte femur ortasından ampute edildi. Histopatolojik inceleme için %10 luk formaldehit solüsyonuna atılarak fikse edildi. 24 saat formaldehit solüsyonunda bekleyen bacaklar %6'lık hidroklorik asit solüsyonuna kondu. 4 gün bekletilerek dekalsifiye edildi. Su ile yıkandıktan sonra uygun takip ve kesim yapıldı. Hematoksilen Eozin yöntemi ile boyanarak histolojik olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Kontrol grubundaki hayvanların iki tanesi 20. ve 30. günlerde öldü. Kalsitonin grubundaki hayvanlarda yaklaşık 30 gramlık kilo kaybı ve tüylerde dökülme saptandı. Kalsitonin grubunda postoperatif 26. günde öldürülen 4 hayvandan bir tanesinin tespit materyalini çıkarmış olduğu, 56.günde öldürülen kalan 4 hayvandan bir tanesinin de tespit materyalini çıkarmış olduğu görüldü. Bu hayvanlar değerlendirme dışı bırakıldı.

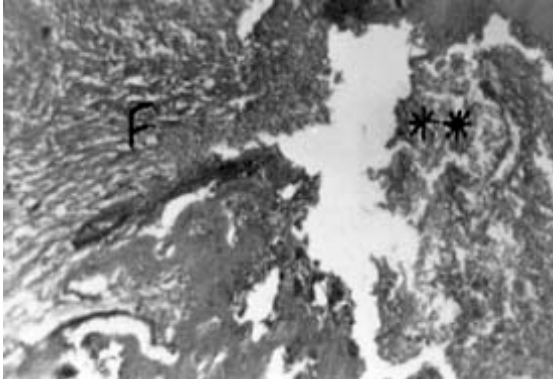
Kırık kaynama evreleri⁸⁻¹⁰ gözönüne alınarak kontrol ve kalsitonin grupları arasında histopatolojik olarak farklılık olup olmadığı değerlendirildi.

5. gün sonunda her iki grupta kırık bölgesinde histopatolojik olarak taze kanama alanları gözlenirken gruplar arasında belirgin bir farklılık görülmedi (Resim 1). Postoperatif 12. gün sonunda

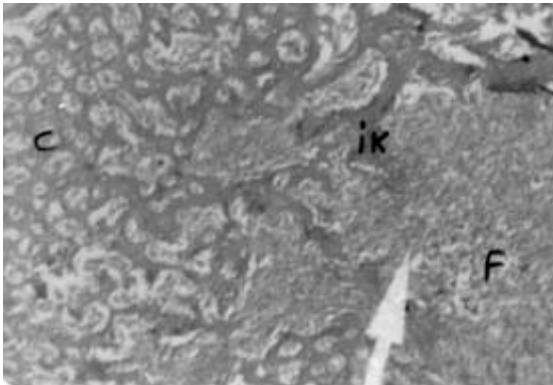


Resim 1: Kontrol grubunun 5. Günü. Kırık bölgesinde çevre dokuda taze kanama alanları(**). Bu bulgular kalsitonin grubunun bulgularıyla benzerlik göstermektedir. (H.E.x10)

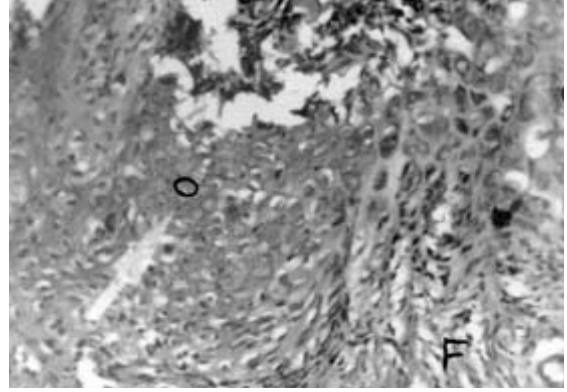
her iki grupta da kapiller damarları ve kronik enflamasyon hücrelerini de içeren bağ dokusu hücreleri ve liflerinin oluşturduğu fibröz kallus hakimiyeti gözlemlendi (Resim 2). 19. gün sonunda her iki grupta da kırık bölgesini kondrositlerden oluşan kıkırdak kallus dokusunun doldurduğu, yer yer immatür kemik haline dönüşmeye başladığı dikkat çekmekteydi ve gruplar arasında belirgin bir farklılık olmadığı gözlemlendi (Resim 3). Kontrol ve deney grubundaki hayvanlarda 26. günde kıkırdakın yerinde, etrafında aktif osteoblastların olduğu osteoid doku görüldü ve her iki grup arasında belirgin bir farklılık gözlenmedi (Resim 4-5). 56. gün sonunda her iki grupta da bol miktarda, makroskopik olarak normal bistiiri ile kesilemeyen, dekalsifikasyona ihtiyaç gösteren nonlamellar kemik trabekülleri görüldü. Kırık



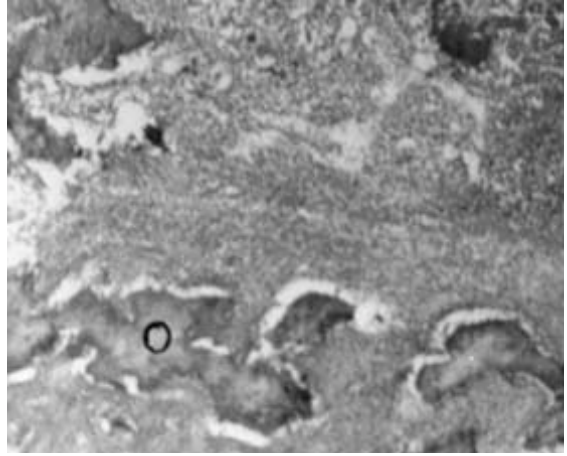
Resim 2: Kontrol grubunun 12. Günü. Kırık kemik lamelleri (*) arasında kronik enflamasyon hücreleri (**) ile birlikte kapiller damarları da içeren bağ dokusu oluşumu (Fibröz kallus)(F). Bu bulgular kalsitonin grubunun bulgularıyla yakın benzerlik göstermektedir. (H.E.x10)



Resim 3: Kontrol grubunun 19. Günü. İmmatür kemik (İ K) haline dönüşmeye başlayan kıkırdak doku (C) ve fibröz kallus (F) bir arada görülmekte. (H.E.x10)



Resim 4: Kalsitonin grubunun 26. Günü. Osteoid (O) oluşumu belirgin olarak gözlenmekte. (H.E.x10)



Resim 5: Kontrol grubunun 26. Günü. Osteoid (O) oluşumu belirgin olarak gözlenmekte. (H.E.x10)

iyileşmesi aşamaları tümüyle gözönüne alındığında kontrol ve kalsitonin grupları arasında hiçbir aşamada histolojik yönden göze çarpıcı büyük bir farklılık gözlenmedi.

TARTIŞMA

Kemikte kırık iyileşmesi ve dolayısıyla yeni kemik oluşumu oldukça karmaşık bir sistemce kontrol edilmektedir. Sistemin bu denli detaylı organizasyonu dolaylı olarak birçok araştırmaya konu olmasına rağmen, henüz bir fikir birliği sağlanamamıştır. Bu bir bakıma normaldir, çünkü iki kırık ve arasında yeni bir kemik köprü oluşmasının, matriks oluşumu, mineralizasyon ve remodeling gibi evreleri birbirlerine karşı çalışıyormuş gibi görünen farklı hücrelerin ve farklı hormonlardan oluşan bir sistemin bütün halinde çalışması sonucunda gerçekleşmektedir.

Ekeland ve arkadaşları, farelerde femur diafiz kırığı oluşturdukları bir çalışmada kalsitonin seviyesinin kırık oluştuktan yirmi dakika sonra arttığını ve üç hafta bu seviyede kaldıktan sonra azaldığını gözlediler¹¹. Meller ve arkadaşları köpeklerin uzun kemiklerinde kırık oluşturup, bu köpeklerin serumlarında paratroid hormon (PTH), kalsitonin, D vitamini metabolitleri, fosfat, kalsiyum, magnezyum ve alkalin fosfataz düzeylerini tayin ettiler. Genelde bu çalışmaların ortak bulgusu kırıkla birlikte serum kalsiyumunun azaldığı, serum kalsitoninin arttığı, aktif vitamin D3'ün erken kırık döneminde değişmeyip, kırığın ileri evrelerinde arttığı şeklindedir^{12,13}. Ömeroğlu ise sağlıklı tavşan modelinde, tek yüksek doz olarak uygulanan vitamin D3'ün kırık iyileşmesi üzerinde pozitif etkisinin olabileceğini vurguladı¹⁴.

Farley kalsitoninin, hücre kültürlerinde değişik tipteki kemik hücrelerinin timidin kullanma kapasitesini ve alkalin fosfataz aktivitesini arttırdığını gösterdi^{4,5}. Bu da osteoblastik hücre proliferasyonu artışının göstergesidir. Toccafaldi farelerde, kalsitoninin osteoblast ve kollagen doku sentezini arttırdığını tespit etti⁷. Farley bir başka çalışmada kalsitoninin kemik matriks sentezine etkisini araştırdı ve pozitif etki gösterdiğini vurguladı³.

Kalsitonin fizyolojik olarak parathormon etkisini antagonize ettiğinden, iskelet dokularında da kalsitoninin parathormon etkisine karşı koyabileceği hipotezi ortaya çıktı. Parathormon bilindiği üzere kemik rezorpsiyonunu artırıp, kemik oluşumunu azaltır. Bu hipotez ister istemez kalsitoninin kemik rezorpsiyonunu azaltıp kemik gelişimini hızlandırabileceği fikrine yol açtı.

İşte bu fikirlerin geçerliliğini belirlemek üzere bazı deneysel ve klinik çalışmalar yapılmıştır^{13,15-17}. Bu çalışmaların bazılarında insan denekler, bazılarında ise deney hayvanları kullanılmıştır. Bu çalışmalar benzer protokollerle yapılmamasına rağmen, kalsitonin tedavisi gören gruplarda osteoblast sayısında anlamlı bir artış, alkalin fosfataz aktivitesinde artış, kırık kallusunda belirgin bir mineralizasyon artışı ile beraber matriks sentezinde gelişme saptanmıştır. Buna karşın diğer araştırmacı gruplar ise kalsitoninin kırık iyileşmesinde anlamlı bir etkiye yol açmadığını bildirmişlerdir^{1,18-21}.

Tachdjian fare humerusunda oluşturduğu kırık sonrası kalsitonin uygulamasının kırık iyileşmesinde anlamlı bir etkisinin olmadığını bildirdi²⁰. Paavolainen ise farelerde tibia kırığı sonrası verilen

kalsitonin hormonunun, kalsitonin verilmeyen kontrol grubuna göre, kırık iyileşmesinde anlamlı bir farklılık oluşturmadığını gösterdi²¹.

Ekeland çalışmalarında kalsitoninin kırık iyileşmesinde ve kollagen sentezinde negatif etkiye sahip olduğunu bildirdi^{1,18,19}. Schatzker tavşanlarda yaptığı çalışmalarda histolojik ve radyolojik olarak kırık kaynaması üzerine kalsitonin hormonunun anlamlı bir etkisinin olmadığını bildirdi²².

Biz çalışmamızda kalsitonin tedavisi gören hayvan grubunda, kontrol grubundan farklı negatif veya pozitif herhangi bir bulgu tespit edemedik. Çalışmamızın sonucu kalsitonin tedavisinin sıçanlarda kırık iyileşmesine anlamlı etkisinin olmadığı şeklindedir. Bu sonuçlar itibariyle, çalışmamız daha önce bildirilen yayınların bazılarıyla tam^{11,16,21,22}, bazılarıyla ise kısmen^{1,18,19} uyumludur. Fakat çalışmamızda kırık kaynama evrelerinde yer alan sıçan sayısının az olması ve kontrol grubuna plasebo verilmemesi nedeniyle, çalışmamız gerçek anlamda kontrollü bir çalışma olmamıştır. Bunun da sonuçlar üzerinde etkili olabileceği düşünülmüştür. Bu sebeplerden dolayı, osteoporoz profilaksi ve tedavisinde yeri olan kalsitonin hormonunun, kırık kaynamasını hızlandırıcı etkisinin olup olmadığını ortaya koymak için daha fazla sayıda hayvanın yer aldığı, plasebo kontrollü çalışmalar yanında yüksek hayvan modeli çalışmaları ve klinik araştırmalar yapılması gerektiği inancındayız.

Çalışmamızda kalsitonin hormonu verilen sıçanlarda ortalama 30 gr. kilo kaybı saptadık. Yapılan bazı çalışmalarda sistemik veya intraserebroventriküler enjeksiyonla kalsitonin verilen sıçanlar ve rhesus maymunlarında besin alımı azalmış ve kilo kaybı gözlenmiştir. Kalsitoninin sıçanlarda pik iştah kesici etkisi, periferal yollarla verilikten 4-8 saat sonra gözlenmiştir. Bu etkinin gastrik sekresyonun inhibisyonuyla mı olduğu yoksa merkezi kökenli bağımsız bir etki mi olduğu bilinmemektedir^{23,24}. Kalsitonin hormonunun sistemik etkileri konusundaki bazı bilinmeyenlerin olması, bu konuda da araştırmaların yapılmasının gerekli olduğunu düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ekeland A, Myhre L, Underdal T. Effects of salmon calcitonin on mechanical properties of healing and intact bone and skin in rats. *Acta Orthop Scand* 1983; 54: 462-9.
2. Baron R, Saffar JL. A quantitative study of the effects of prolonged calcitonin treatment on alveolar bone remodelling in the golden hamster. *Calcif Tissue Res* 1977; 22(3): 265-74.

3. Farley RJ, Tarbaux NM, Hall SL, Linkhart TA. The antihone resorptive agent calcitonin also acts in vitro to directly increase bone formation and bone cell proliferation. *Endocrinology* 1988; 123: 159-67.
4. Farley RJ, Hall SL, Tarbaux NM. Calcitonin increases mouse bone cell proliferation in a dose dependent manner, and increases mouse bone formation, alone and in combination with flouride. *Calcif Tissue Int* 1989; 45: 214-21.
5. Farley RJ, Wergedal JE, Hall SL, Herring S. Calcitonin has direct effects on H.Thymidine incorporation and alkaline phosphatase activity in human osteoblast-line cells. *Calcif Tissue Int* 1991; 48: 297-301.
6. Lupulescu A, Habowsky J. Effects of calcitonin on wound healing a morphological study in rabbits. *J Surg Res* 1978; 25: 260-8.
7. Toccafondi R, Brandi ML, Mavilia C, Zonefrati R. Biological effects of salmon calcitonin in osteoblast-like cells. *Excerpta Medica, Amsterdam, New York, Oxford* 1985; 197-204.
8. Frost HM. The biology of fracture healing Part-1. *Clin Orthop* 1982; 248: 283-93.
9. Rosai J. Bone and Joints. In: Rosai J. Ed. *Ackerman's Surgical Pathology*. 8th ed. Mosby Company, 1995: 1920-25.
10. Sissons HA.: Bones, In: Symmers WSC. Ed. *Systemic Pathology*. 2nd ed. Churchill Livingstone, 1979: 2401-2.
11. Ekeland A, Gautvik MK, Myhre L. Increase in plasma calcitonin following femoral fracture in rats. *Acta Orthop Scand* 1981; 52: 513-8.
12. Meller Y, Kestenbaum R. Mineral and endocrine metabolism during fracture healing in dogs. *Clin Orthop* 1984; 187: 289-95.
13. Meller Y, Shainkin R, Kestenbaum R, Shany S, Zuilli I. Parathyroid hormone, calcitonin and vitamin D metabolites during normal fracture healing in humans. *Clin Orthop* 1984; 183: 238-45.
14. Ömeroğlu H, Ateş Y, Akkuş O, Korkusuz F, Biçimoğlu A, Akkaş N.: Biomechanical analysis of the effects of single high-dose vitamin D3 on fracture healing in a healthy rabbit model. *Arch Orthop Traum Su: 1997* 116 (5): 271-4.
15. Lindgren JU, Narechania RG, McBeath AA. Effects of 1-25 dihydroxy vitamin D3 and calcitonin of fracture healing in adult rats. *Clin Orthop* 1981; 160: 304-8.
16. Luisetto G, Melanotte S, Caira S. Effect of salmon calcitonin on bone callus formation in man. *Curr Ther Res* 1988; 41: 572-8.
17. Melanotte PL, Caria S. Salmon calcitonin effect on proximal femur fracture repair in elderly patients. *Curr Ther Res* 1986; 39: 449-54.
18. Ekeland A, Gautvik MK, Underdal T. Calcitonin producing tumour. *Acta Orthop Scand* 1983; 54: 760-7.
19. Ekeland A, Underdal T. Effect of salmon calcitonin on synthesis and mineralization of collagen in rats. *Acta Orthop Scand* 1983; 54: 470-8.
20. Ewald F, Tachdjian MO. The effect of thyrocalcitonin on fractured humeri. *Surg Gyn Obst* 1967; 125(5): 1075-80.
21. Paavolainen P, Taivainen T. Calcitonin and fracture healing. An experimental study on rats. *J Orthop Res* 1989; 7: 100-6.
22. Schatzker J, Chapman M. The effect of calcitonin on fracture healing. *Clin Orthop* 1979; 141: 303-6.
23. Doepfner WEH: Pharmacological effects of Calcitonin. *Triangle* 1983; 22 (2/3): 57-67.
24. Deftos LJ: Dış Kaynaklı (Eksojen) Kalsitonin. Azria M. Ed. *Kalsitoninler (Fizyoloji ve Farmakoloji)*. Sandoz Ürünleri AŞ. Orhanlar Matbaası İstanbul 1989: 100.