

TAVŞANLARDA KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ALFA – TOKOFEROLÜN ETKİSİ

*Davut KESKİN**, *Orhan KARSAN***, *Naci EZİRMİK**
*Akif ÇİFTÇİOĞLU****

ÖZET

Çalışmamızda alfa-tokoferol'ün (E vitamini) kırık iyileşmesi üzerine olan etkileri 30 adet tavşan üzerinde araştırıldı. Tavşanlar randomize olarak deney ve kontrol olmak üzere iki eşit gruba ayrıldı. Deneklerin sol fibulaları lokal anestezi altında kırıldı. Deney grubundaki tavşanlara kırktan 1 saat önce başlanarak 5 gün süreyle 20 mg/kg/gün alfa-tokoferol IM olarak enjekte edilirken kontrol grubundakilere ilaç verilmedi. Kırktan 4 hafta sonra intraperitoneal sodyum pentobarbital uygulanarak tavşanlar öldürüldü ve otopsi yapılarak kırık bölgesinden doku örnekleri alındı. Bunların histopatolojik incelenmesi sonucu deney grubundaki tavşanlarda kırık kaynamasının daha iyi olduğu tesbit edildi. Bu durum E vitamininin kırık bölgesinde oluşan serbest oksijen radikalleri üzerine antioksidan etki göstermesine bağlandı. Çalışmanın sonucunda, alfa-tokoferolün kırık oluştuktan sonraki erken dönemde profilaktik olarak uygulanmasının kırık iyileşmesini olumlu yönde etkileyeceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Kırık İyileşmesi, Serbest Oksijen Radikali, Alfa-Tokoferol.*

SUMMARY

THE EFFECT OF ALPHA-TOCOPHEROL ON FRACTURE HEALING IN RABBITS

Purpose: The effects of alpha-tocopherol (vitamin E) on the fracture healing were examined on rabbits.

Materials and Method: Thirty rabbits were divided into two groups randomly as experiment and control groups. In the left fibulas of the guineas were made iatrogenic fracture under local anaesthesia. Medicine wasn't administered to the rabbits in control groups, whereas 20 mg/kg/day alpha-tocopherol IM for five days was administered

to those in experiment group by starting an hour before fracture. Four weeks after fracture, intraperitoneal sodium pentobarbital was administered, and the rabbits were killed and tissue samples were obtained.

Results: As a results of histopathologic examination of tissue samples with the light microscope, it was determined that fracture healing became better in the rabbits in experiment group. This situation was based on the influence of antioxidant on free oxygen radicals occurring in fracture region of vitamin E.

Conclusion: In early period after fracture-occurrence, it was concluded that the prophylactic administration of alpha-tocopherol would affect fracture healing positively.

Key Words: *Fracture Healing, Free Oxygen Radical, Alpha-Tocopherol.*

GİRİŞ

Aerob organizmalarda normal oksijen metabolizmasının bir sonucu olarak serbest radikaller diye isimlendirilen reaktif oksijen türleri üretilir. Bunların en önemlileri süperoksid, hidrojen peroksid ve hidroksil radikalleridir¹⁻⁴.

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederek hücre hasarı ve sonunda hücre ölümüne yol açarlar. Diabetes mellitus, kanser, yaşlanma, sigara içimi ile ilgili kronik hastalıklarda rol oynadıkları, yara iyileşmesi, granülasyon dokusu, kollajen ve kırık dokusu üzerine olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir¹⁻⁴. Son yıllarda bunların kırık iyileşmesine olan etkilerini inceleyen yayınlara da rastlanmaktadır^{3,4}.

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücut tarafından antioksidan savunma sistemleri geliştirilmiştir. Alfa-tokoferol (E vitamini) doğal

* Yrd. Doç. Dr., Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı.

** Doç. Dr., Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı.

*** Doç. Dr., Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı.

antioksidanlardandır^{1,5-7}. Çalışmamızda, alfa-tokoferolün kırık iyileşmesine olan etkileri tavşanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmayla araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

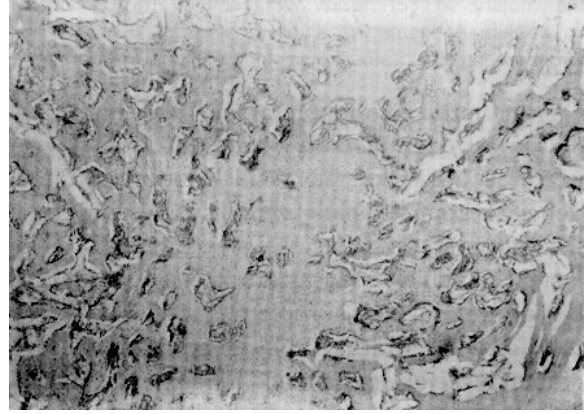
Bu çalışmada ağırlıkları 1.5-2.0 kg. arasında ve ortalama yaşları 8 ay olan 30 adet erkek albino tavşan kullanıldı. Tavşanlar randomize olarak her birinde 15 tane olmak üzere A ve B gruplarına ayrıldı. A (kontrol) grubuna herhangi birşey verilmezken, B (deney) grubundaki tavşanlara 20 mg/kg/gün alfa-tokoferol (E vitamini; Ephynal-Roche) kırktan 1 saat önce başlanmak üzere 5 gün süreyle IM olarak enjekte edildi. Bütün tavşanların sol arka ekstremiteleri sabitleştirildikten sonra fibula bölgesi %10 serbest alkol içeren 10 gr. polivinyl pyrolidon-iyod kompleksi (Batticon-Adeka) ile dezenfekte edildi. 2.5 cc kadar alfa-propilaminopropion-o-toluidid (Citanest-Astra) ile lokal anestezi sağlandıktan sonra 1-2 cm'lik lateral bir insizyonla girilerek fibula orta kısmına ulaşıldı. Fibulada bir makas yardımı ile nondeplase veya minimal deplase transvers kırıklar oluşturuldu. Girişim sonrası yara suture edildi ve gaz tampon ile sarıldı. İşlem sonrası kontrol radyogramları çekilerek aynı tip kırık oluşup oluşmadığı incelendi. Çalışmayı sonlandırma zamanını belirlemek için haftada bir çekilen röntgen grafilerinde 4. haftada kallus gelişiminin izlenmesi üzerine %26 oranında sodyum pentobarbital 1 mg/kg intraperitoneal olarak uygulanıp denekler öldürüldü. Otopsi yapılarak kırık bölgesinden doku örnekleri alındı. Kemik spesmenleri %10'luk formalin ile tesbit edildikten sonra %3'lük formik asit içerisine atılıp 5 gün süreyle bekletilerek dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyonun ardından parafin bloklama işlemi yapıldı. Tüm gereçten 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak hematoksilen-eozin boyama yöntemiyle boyandı. Preparatlar ışık mikroskopu ile değerlendirildi. Her denek için 10 ayrı 100 X'lük büyütme alanı tarandı. Değerlendirmede osteoblastik etkinlik, fibroblastik proliferasyon, kallus içi kondroid yapı ve osteoid yapımı bulunup bulunmamasına göre kırık iyileşmesi 5 grade ayrıldı (Tablo I)^{8,9}.

Tablo I
Kırık İyileşme Dereceleri

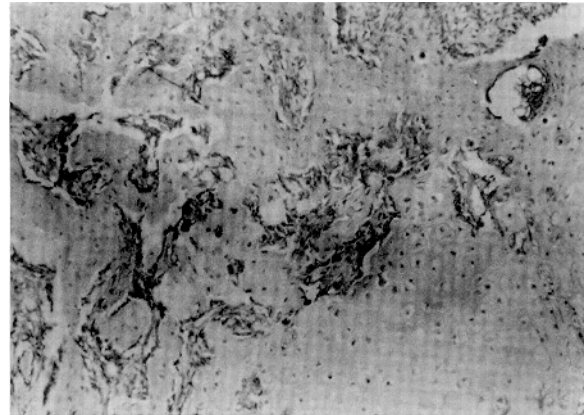
Histolojik	Grade
Psödoartroz oluşumu	0
İnkomplet kartilajinöz kaynama	1
Komplet kartilajinöz kaynama	2
İnkomplet kemiksel kaynama	3
Komplet kemiksel kaynama	4

SONUÇLAR

Deney grubundaki hayvanların tümünde inkomplet kemiksel kaynama (Grade 3) görülürken, kontrol grubundakilerin 3'ünde inkomplet kemiksel kaynama, 12 tanesinde ise komplet kartilajinöz kaynama (Grade 2) olduğu tesbit edildi (Şekil 1, 2).



Şekil 1: Kontrol grubuna ait histolojik preparat (Komplet kartilajinöz kaynama: Kıkırdak gelişimi ve fibroblastik proliferasyon (HE, 40X).



Şekil 2: Deney grubuna ait histolojik preparat (İnkomplet kemiksel kaynama: Osteoid doku, osteoblastik aktivite, kıkırdak gelişimi ve fibroblastik proliferasyon (HE, 100X).

Veriler istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi ile analiz edildi ve her iki grup arasındaki fark anlamlı bulundu ($p < 0.01$).

TARTIŞMA

Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Bu tür moleküller ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Serbest radikaller hücrelerin protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi

bileşiklerine de etki etmekle birlikte asıl etkilerini membran lipidleri üzerinde (lipid peroksidasyonu) gösterirler. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin (poly unsaturated fatty acid-PUFA) oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve meydana gelen membran hasarı geri düşünümüştür^{1-5,10,11}.

Serbest radikallerin biyolojik ve intrasellüler kaynakları vardır: Biyolojik kaynaklar; aktive olmuş fagositler, antineoplastik ajanlar, radyasyon, alışkanlık yapan maddeler, çevresel ajanlar ve stres, intrasellüler kaynaklar ise; küçük moleküllerin otooksidasyonu, enzimler ve proteinler, mitokondrial elektron transport sistemleri, peroksizomlar, plazma membranı ve oksidatif stres yapıcı durumlardır (Ör: travma, iskemi)^{1,2}.

Reaktif oksijen türleri ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidanlar olarak bilinir. Antioksidanlar peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar doğal (endojen kaynaklı) ve ekzojen kaynaklı olmak üzere ikiye ayrılırlar. Alfa-tokoferol (vitamin E) doğal antioksidanlardandır. Hücre membran fosfolipidlerinde bulunan polisansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. E vitamini superoksid ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksi radikallerini indirger^{1,3,5-7,10}.

Doku iskemisi sırasında meydana gelen hasarın büyük bir bölümü, moleküler oksijenin dokuya girdiği reperfüzyon esnasında oluşur. İskemi sırasında endojen fosfolipazlar aktive olur ve hücre membran fosfolipidlerinden araşidonik asidi serbestleştirerek membran bütünlüğünün bozulmasına neden olurlar. Ayrıca ksantin oksidaz da iskemiyle aktive olur. Bunlar serbest radikal oluşumu için potansiyel mekanizmalardır. Reperfüzyonun böbrek, beyin, kalp, iskelet adaleleri ve barsaklar gibi hayati olan organlar üzerine olan olumsuz etkileri gösterilmiştir^{1-4,12,13}.

Son yıllarda serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesi üzerine olan etkilerini içeren nadir yayınlara rastlanmaktadır^{3,4}.

Uzun bir kemik kırıldığı zaman kırık bölgesinde arteriyel vazokonstriksiyon gelişir. Takiben geçici bir iskemik periyod ve arteriyel vazodilatasyon ve kırık bölgesinde reperfüzyonda bir artış olur. Kırığın çevresindeki yumuşak dokuların zedelenmesine

neden olan unsurlardan birisinde iskemi-reperfüzyon olduğu bilinmektedir. Kırık oluşuktan hemen sonra inflamatuvar, onarım ve remodelizasyon fazlarını içeren iyileşme periyodu başlar. Kırık hematomu kırık iyileşmesi için gerekli temel öğeleri içerir. Kırık iyileşmesinin erken dönemi oldukça önemlidir. Başlangıç fazında (ilk 5 gün) inflamatuvar hücreler (lokosit, makrofaj ve mast hücreleri) kırık bölgesine ulaşırlar. Polimorfonükleer lokositlerin aktivasyonu ile üretilen serbest oksijen radikallerinin yara iyileşmesi ve granülasyon dokusunu bozdukları bildirilmiştir^{3,4,14}.

Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve etki mekanizmaları göz önüne alındığında kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etkilerinin olacağı muhtemel görünmektedir. Nitekim, Göktürk, ön kollarını manuel kompresyon ile kırdığı sıçanların bir kısmına polimorfonükleer lokositlerdeki NADPH oksidazı uyarak serbest oksijen radikalleri oluşturmak için zymosan uygulamış ve bu grupta kırık iyileşmesinin bozulduğunu saptamıştır. Sonuç olarak serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesinde önemli rolleri olduğu kanaatine varmıştır⁴.

Garett ve ark. kültür kemikleri üzerinde yaptıkları inceleme sonucunda serbest oksijen radikallerinin ve özellikle süperoksid'in osteoklast oluşumu ve aktivasyonunda dolayısı ile kemik rezorbsiyonunda arabulucu rol oynadıklarını göstermişlerdir¹⁵.

Serbest oksijen radikalleri kırık iyileşmesini olumsuz olarak etkiliyorsa bunların oluşmasını engelleyecek vitamin E'ninde içinde yer aldığı antioksidan diye isimlendirilen maddelerin de zıt etkilerinin olması gerekir. Engle ve ark. in vitro olarak yaptıkları çalışmalarında, vitamin E'nin serum seviyelerine bağlı olarak polimorfonükleer lokositler tarafından bakterileri öldürmek için üretilen önemli bir oksijen radikali olan superoksid anyonunun üretimini önemli oranda azalttığını bulmuşlardır¹⁶.

Durak ve ark. femurlarını kırdıkları tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında; IM olarak serum fizyolojik verdikleri kontrol grubunda serbest oksijen radikallerinin etkilerinin kırık hematoma sıvısında plazmadan daha kuvvetli olduğunu bulmuşlardır. Buna kırık bölgesinde gelişen ve serbest oksijen radikal üretimi ve lipid peroksidasyon artışı ile sonuçlanan iskemi ve reperfüzyonun sebep olduğunu ileri sürmüşlerdir. Alfa-tokoferol enjekte edilen grupta ise plazma ve kırık hematoma sıvısında konjuge dien değerlerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu tesbit etmiş ve alfa-tokoferolün kırık hematoma sıvısında oluşan serbest oksijen radikalleri üzerinde antioksidan bir etkiye sahip olduğu

sonucuna varmışlardır. Kırık iyileşmesinin başlangıç döneminde profilaktik alfa-tokoferol (vitamin E) uygulamasının, femur kırığı gibi hemoraji riski olan olgularda, serbest radikallerin bütün vücut sistemleri ve kırık iyileşmesi üzerine olan olumsuz etkilerini azaltacağını bildirmişlerdir³.

Kovishnikov ve ark. bir pestisid olan Dıpal verilen tavşanlarda osteoblast ve kartilaj hücrelerinin çoğalmasının gerilediğini, ancak bir antioksidan olan E vitaminin Dıpal'in etkilerini azalttığını bulmuşlardır¹⁷. Melhus ve ark. serbest radikal oluşumunu artırarak kemik rezorbsiyonuna sebep olduğu bildirilen sigaranın artırdığı kalça kırığı riskinin diyetle alınan vitaminlerle değişip değişmediğini inceledikleri çalışmalarında; diyetle yeterli miktarda E vitamini alınmasının kalça kırığı ihtimalini azalttığını tesbit etmişlerdir¹⁸.

Kırık iyileşmesinin erken dönemi çok önemlidir. Kırık oluştuktan hemen sonra iskele ve reperfüzyon oluşması, kırık hematomunda lokositlerin birikmesi serbest oksijen radikallerinin oluşması için uygun ortam sağlar. Çalışmamızda, fibulalarında kırık oluşturulan ve IM olarak 5 gün süreyle alfa-tokoferol enjekte edilen deney grubundaki tavşanlarda, kontrol grubundakilere göre kalitatif olarak kaynamanın daha iyi olduğu görülmüş ve alfa-tokoferolün bu etkisi kırık bölgesinde oluşan serbest oksijen radikalleri üzerine olan antioksidan etkisine bağlanmıştır. Sonuç olarak, alfa-tokoferolün kırık oluştuktan sonra erken dönemde profilaktik olarak kullanılmasının kırık kaynamasını olumlu yönde etkileyeceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza, 1995.
2. Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1983; 94: 407-411.
3. Durak K, Bilgen ÖF, Kaleli T, Tuncel P, Özbek R, Turan K. Antioxidant effect of alfa-tocopherol on fracture haematoma in rabbits. *J Int Med Res* 1996; 24: 419-424.
4. Göktürk E. Sıçanlarda serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesine etkisi. *Acta Orthop Traumatol Turc* 1997; 31: 353-356.
5. Liebler DC. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23: 147-169.
6. Traber MG, Packer L. Vitamin E. Beyond antioxidant function. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 1501-1509.
7. Burton GW, Foster DO, Perly B, Slater TF, Smith IC, Ingold KU. Biological antioxidants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985; 17: 565-578.
8. Gurley AM, Roth SI. Bone. In: Sternberg SS, ed. *Histology for pathologists*. New York: Raven Press, 1992: 61-79.
9. Allen HL, Wase A, Bear WT. Indomethacin and aspirin. Effect of nonsteroidal antiinflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta Orthop Scand* 1980; 51: 595-600.
10. Takenaka Y, Miki M, Yasuda H, Mino M. The effect of alpha-tocopherol as an antioxidant on the oxidation of membrane protein thiols induced by free radicals generated in different sites. *Arch Biochem Biophys* 1991; 285: 344-350.
11. Defraigne JO, Pincemail J, Franssen C, Meurisse M, Defechereux T, Philippart C, Serteyn D, Lamy M, Deby C, Limet R. In vivo free radical production after cross-clamping and reperfusion of the renal artery in the rabbit. *Cardiovasc Surg* 1993; 1: 343-349.
12. Serin E, Yılmaz E, Yılmaz S, Ünsaldı E, Durmuş AS. İskemi-reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikalleri (Ratlarda deneysel çalışma). *Artroplastı Artroskopik Cerrahi* 1998; 9: 36-39.
13. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Condorelli E, Raddino R. Role of oxygen in myocardial ischaemic and reperfusion damage: Effect of alpha-tocopherol. *Acta Vitaminol Enzymol* 1985; 7: 61-70.
14. Turek SL. Histology and histopathology of bone. In: *Orthopaedics: Principles and their applications*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Co, 1977: 31-81.
15. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo ROC, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1990; 85: 632-629.
16. Engle WA, Yoder MC, Baurley JL, Yu P. Vitamin E decreases superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes. *Pediatric Res* 1998; 23: 245-248.
17. Koveshnikov VG, Pikaliuk VS. The proliferative processes in the skeleton of white rats administered dipal experimentally and after antioxidant therapy with tocopherol. *Morfologiya* 1993; 104: 34-39.
18. Melhus H, Michalsson K, Holmberg I, Wolk A, Ljunghall S. Smoking, antioxidant vitamins, and the risk of hip fracture. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 129-135.