

Lokal pH değışikliklerinin osteogenese etkisi

Deneysel araştırma

Osman Güven ⁽¹⁾

Bu çalışmada, sıçanlarda lokal enjeksiyonlarla kırık ortamının pH'sı değıştirildi. 7,14 ve 21. günlerde histopatolojik ve radyolojik yöntemlerle inceleme yapılarak kırık iyileşmesi incelendi. Sonuçta, geç devrede kırık ortamının alkali yönde değıştirilmesinin osteogenesisi arttırdığı tesbit edildi.

Effects of local pH changes on osteogenesis

pH degree of microenvironment of the fracture was changed in this experimental research by local injections in rats. Fracture healing was observed at 7,14 and 21th days, both radiologically and histopatologically. As a result, it has been defined that alkaline levels of Ph in microenviroment of fracture increase the osteogenesis.

Kırık iyileşmesinde lokal ve sistemik faktörler etkilidir. Lokal faktörler arasında, ortamın pH seviyesi halen önemini korumaktadır. Kırık iyileşmesinde akut fazda ortamın asit olduğu, zamanla nötrale ve geç fazlarda alkaliye döndüğü Stirling (11) tarafından 1932'de belirtilmiştir. Simmons (10) 1985'de aynı bulgudan bahsetmiştir.

Kemikte asiditenin artması lokal demineralizasyona yol açar. Demineralizasyon amacı ile HCl, EDTA gibi, asit solüsyonlar kullanılmaktadır (1,13). PTH verilmesinin Laktat yapımını arttırdığı, bununda pH'yı azaltarak lokal demineralizasyona sebep olduğu bilinen bir gerçektir (18).

Kemik kalsifikasyonunu açıklayan ve Robison'un (16) 1923'de ortaya attığı teoride, kalsifiye kemiklerde yüksek oranda fosfataz enziminin bulunduğu ve bunun alkali pH seviyelerinde çok aktif olduğu, bu sebepten Alkale fosfataz adını aldığı belirtilmektedir. Bu şekilde mineralizasyonun arttığı ileri sürülmektedir (6,7).

Bu görüşe karşın, 1986'da Yoshikawa (19) ve 1978'de Pfeilschifter (8) lokal çevrenin asit olmasının kemik yapımını indüklediğini ileri sürmüşlerdir. Osteogenesisi etkileyen lokal büyüme faktörleri; BMP (Bone morphogenic protein), TGF-B (Transforming Growth Factor-B), BDGF (Bone derived growth factor), Makroglobülin, CTF (Cartilage derived factor), PDGF (Plateled derived growth factor)'dür. Bunlardan özellikle BMP ve TGF-B ortamın asiditesinden etkilenirler (8,12).

Bütün bu faktörler pH'nın kırık iyileşmesinde önemli rolü olduğunu göstermektedir. Bu nedenle bu konunun araştırılması planlandı.

Materyal ve Metod

Bu araştırma Marmara Üniv.Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda yapıldı.

Bu çalışmada 4 (adet Swiss Albino tipi, ortalama ağırlıkları 318,5 gr. 3 aylık gelişmekte olan sıçanlar kullanılmış ve cins ayrımı gözetenilmemiştir. Hayvanlardan 8 tanesi deney metodunu yerleştirme amacı ile kullanıldı. Deney ve kontrol gruplarında kullanılan hayvanlar musluk suyu ve normal laboratuvar diyeti ile beslendiler ve altmış gruplar halinde metalik kafeslerde muhafaza edildiler.

Çalışmada deneyler 6 grup hayvanında yapıldı.

I. Kontrol grubu -A: 6 sıçandan oluşan bu gruba aynı manuel yolla sağ tibialarına kırık yapıldıktan sonra 3. günden itibaren 9. güne kadar kırık bölgesine hergün 0,05 cc. serum fizyolojik (SF) enjekte edildi.

II. Kontrol grubu-B: 6 sıçandan oluşan bu gruba aynı yolla kırık yapılarak 9. günden itibaren hergün kırık bölgesine 0,05 cc. SF enjekte edildi.

III. Deney grubu-A₁: (6 sıçan) Bu gruba kırık oluşturulduktan sonra 3. günden itibaren 9. güne kadar hergün 0,05 cc. pH'sı 6,2 olan HEPES solüsyonu kırık yerine verildi.

IV. Deney grubu-A₂: (6 sıçan) Kırık oluşturulduktan sonra 9. günden itibaren hergün 0,05 cc.pH'sı 6,2 olan HEPES solüsyonu enjekte edildi.

V. Deney grubu-B₁: (6 sıçan) Kırık oluşturulduktan sonra 3-8. günlerde kırık yerine pH'sı 7,8 olan HEPES solüsyonu 0,05 cc. olarak verildi.

VI. Deney grubu-B₂: (6 sıçan) Kırığı takiben 9. günden itibaren kırık yerine 0,05 cc. pH'sı 7,8 olan HEPES solüsyonu enjekte edildi.

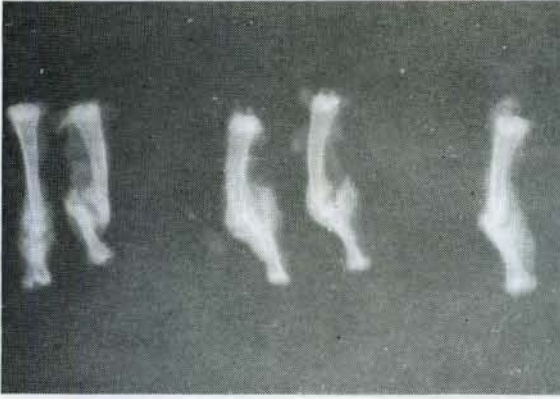
Deneyde ortamın pH'sını değıştirmek amacı ile tamponlu bir solüsyon olan HEPES solüsyonunun kullanılması nedeni, bilindiği gibi tamponlu solüsyonların doku içinde resorbe olmadan daha uzun süre kalabilmeleri ve ortamdaki kolayca uzaklaşmamlarıdır. Asit ve alkali solüsyonlar hazırlandıktan sonra milipordan geçirilerek sterilize edildi.

Asit ve alkali solüsyonları lokal olarak vermemizin nedeni, sistemik olarak verildiğinde lokal değışiklik elde edilebilmesi için yüksek dozlar gerekmesi ve bunun ise sistemik metabolik bozukluklara yol açması, hatta ölüme sebep olmasıdır.

Kırık bölgesinde pH seviyeleri, dokulardan örnek alınarak ve alınır alınmaz hemen elektronik pH metre ile ölçüldü. Bu ölçümlerde lokal enjeksiyonu takiben 4 saat kadar ortamdaki pH değışikliklerinin sürdüğü tesbit edildi.

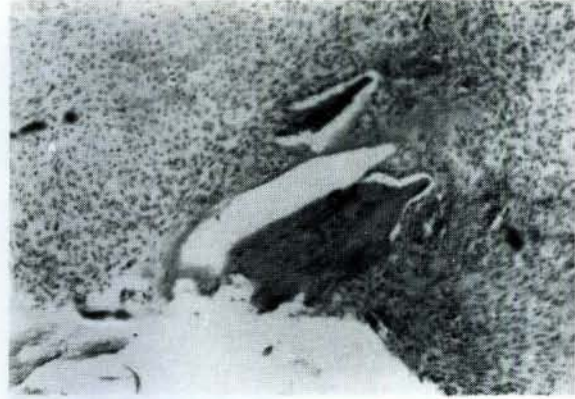
Her grupdan 7,14, ve 21. günlerde ikişer sıçan öldürülerek, kırık olan tibiaları spesmen olarak alındı ve histopatolojik olarak incelendi.

(1) Marmara Üniv.Tıp Fak.Ortopedi ve Travm A.b.d. Yard.Doç.



Resim-1:
(H.E.X 40)
21. günde sırasıyla kontrol, alkali ve asit gruplarından örnekler (Ortadaki 2 tibia alkali grubuna ait).

Aynı günlerde bütün hayvanların tibialarının radyolojik tetkiki yapıldı.



Resim 2:
(H.E.X 40)

Sonuçlar

1- Radyolojik inceleme: 7. ve 14. günlerde gruplar arasında bariz radyolojik bir fark görülmedi. Ancak 21. günde deney grubu B₂'de diğer gruplara oranla kallus dansitesinin daha fazla olduğu tesbit edildi. (Resim 1).

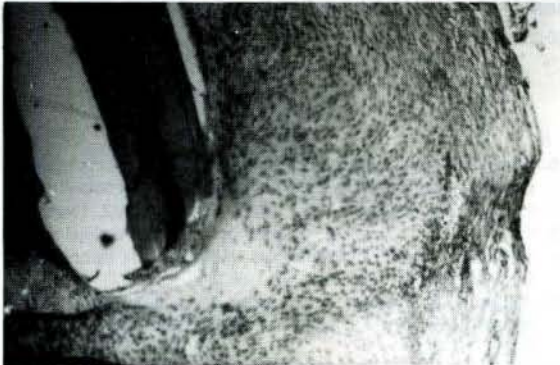
2- Histopatolojik inceleme:

7. Gün: (A, A₁, ve B₁ grupları incelendi)

Grup A'da (Kontrol) kırık bölgesinde kemiğin her iki tarafında periost altında az miktarda yeni kemik oluşumu, geniş sahalar halinde fibröz doku ve kırık doku dikrati çekmekteydi. (Resim 2).



Resim 3: (H.E.X 40)



Resim 4: (H.E.X 40)

Tartışma

Wray (17) 1970'de insanlarda kırık hematomunda pH değerlerini araştırmış ve hematomdaki ortalama pH değerlerinin normalden düşük olduğunu göstermiştir. Laktik asit seviyelerini normalden yüksek bulmuştur. Alkalin fosfataz seviyesini ise yüksek bulmuştur. pH'nun düşmesini laktik asit seviyesinin artmasına bağlamıştır.

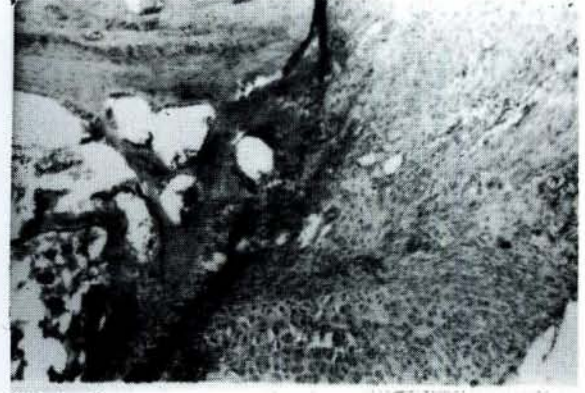
Howell ve ark. (5) 1968'de yaptığı deneysel çalışmada ratların büyüme kırıkdaıklarında, mineralizasyonun olduğu bölgelerde yüksek pH tesbit etmişlerdir (7.70 ± 0.05). PCO₂'deki azalmanın kartilaj beslenmesini bozduğunu ve pH'da düşme olduğunu belirtmişlerdir. Ayrı-



Resim 5: (H.E.X 40)



Resim 6: (H.E.X 40)



Resim 7: (H.E.X 40)

ca raşitlik ratlarda ortalama pH seviyesinde hafif düşme olduğunu göstermişler ve ortamın asiditesinin mineralizasyonu azalttığını belirtmişlerdir.

Brighton (3,4) elektrik uygulaması ile tedavi ettiği kırıklarda katod çevresinde ortamın pH'sının alkali olduğunu, PCO_2 'nin ise artmış olduğunu belirtmiştir. Renoij'de bu görüşü desteklemiştir (9).

Watson (15) 1983'de aynı şekilde negatif elektodda oksijen azalması olduğunu ve hidroksil radikallerinin yapımına bağlı pH'da yükselme olduğunu belirtmiştir.

Vaes (18) 1988'de yayınladığı geniş derlemede, osteoklastik rezorbsiyon bölgelerinde asit pH bulunduğunu belirtmiştir. Blair (2) kemik partiküllerinin rezorbsiyonunun asit fosfataza bağlı olduğunu, bunun da yaklaşık olarak pH 4 civarında aktif olduğunu belirtmiştir.

Kuhlman ve Downs (6) 1963'de alkalin fosfatın 8.4-10.5 pH'da aktif olduğunu bunun da osteogenesis de önemli bir faktör olduğunu söylemişlerdir. Fosfat bileşiklerini katalize ederek organik matriksin mineralizasyonuna yol açtığını belirtmişlerdir. Son teoriler asit fosfatın ise 4.5-6.1 pH'da aktif olduğu ve bu enzimin osteoklastlarda sentez edildiğini ve kemik kaybının indikatörü olduğunu belirttiler. Bu çalışmalarını 1923'de Robison'un ortaya attığı kemik mineralizasyonu hakkındaki teorisini desteklemektedir. Yoshikawa ve Pfeilschifter ve arkadaşlarının osteosarkomlarda yaptığı 1986 ve 1987 yıllarındaki çalışmalarda ise asit solüsyonların osteogenesisi artırdığı deneysel olarak gösterilmiştir (8,19). Buna paralel olarak Urist (14) 1983'de BMP'in alkali solüsyonlarda inaktif olduğunu belirtmektedir.

Bu yayınlardan çıkan ortak sonuç şudur: Kırık ortamı başlangıçta asit olmakta ve bu muhtemelen osteogene-

si indüklemektedir. Ancak asidite diğer devrelerde bunun tam tersi bir etki yapmakta ve kemik demineralizasyonuna yol açmaktadır. Ortamın alkali olması ise geç devrede osteogenesisi ve özellikle mineralizasyonu arttırmaktadır.

Biz bu çalışmada bu fikirden hareket ederek ortamın pH'sını değiştirerek kırık iyileşme hızını artırmayı planladık. Ortamın PH'sını erken devrede ve geç devrede değiştirmenin sonucu ne yönde değiştirdiğini anlamak amacı ile 6 grup oluşturduk. Howell (5), mineralizasyon için uygun pH'nın $7,60 \pm 0,5$ olduğunu belirtmiştir. Biz de araştırmamızda pH'sı buna yakın bir solüsyon (7.8 Hepes solüsyonu) kullandık. Ortamı asit yapmak için ise 6.2 pH'lı HEPES solüsyonu kullandık.

Asit kullanılan gruplarda olumlu bir netice alamadık, aksine osteogenesisinde gerileme tesbit ettik. Gruplardan sadece B₂'de osteoid doku ve mineralizasyonda artma tesbit ettik (radyolojik ve histopatolojik). Bu gruba geç devrede yani dokuzuncu günden itibaren alkali solüsyon verilmişti. Buradan çıkardığımız sonuç şudur: Kırık iyileşmesinde geç devrede ortamın pH'sının alkali olması gerekmektedir veya başka bir deyişle alkali ortam osteogenesis ve mineralizasyonu arttırmaktadır. Bu sonuç uzun zamandır bir kenara itilmiş bulunan Robison'un (16) teorisini tekrar gündeme getirmektedir. Ayrıca bu sonuç özellikle kaynama gecikmesi ve kaynamama sorunlarının çözümü için önemli bir mesaj vermektedir. Psödoartrozlarda veya kaynama gecikmesi durumlarında bu tip enjeksiyonlarla mineralizasyon ve osteogenesisi arttırmak belki de mümkün olabilecektir. Bu konunun hem deneysel olarak hem de klinik daha fazla araştırılması gereklidir.

Kaynaklar

1. Addadi L, Weiner S. Interactions between acidic proteins and crystals: Stereochemical requirements in biomineralisation. Proc Natl Acad Sci USA. 82: 4110-4114, 1985.
2. Blair HC, Kahn AJ, Crouch EC, Jeffrey JJ, Teitelbaum SL. Isolated osteoclasts resorb organic and inorganic components of bone. J Cell Biol. 102: 1164-1171, 1986.
3. Brighton CT, Black J, Friedenber ZB, et al. A multicenter study of the nonunion with constant direct current. J Bone Joint Surg 63-A: 2-13, 1981.
4. Brighton CT, Adler S, Black J, et al. Cathodic oxygen consumption and electrically induced osteogenesis. Clin Orthop. 107: 277-282, 1975.
5. Howell DS, Pita JC, Marquez JF, Madruga JE. Partition of calcium phosphate and protein in the fluid phase aspirated at calcifying sites in epiphyseal cartilage. J Clin Invest. 47: 1121-1132, 1968.
6. Kuhlmann RE, Downs ME. Biochemical biopsy of skeletal system lesions: Application of quantitative microchemical techniques. J Bone Joint Surg. 45-A: 742-752, 1963.
7. Markovic B, Cvitevic A, Karakasevic J. Acid and alkaline phosphatase activity in bone cyst fluid. J Bone Joint Surg. 70-B: 27-28, 1988.
8. Pfeilschifter J, D'souza S, Murdy Gr. Effects of transforming growing factor B on osteoblastic osteosarcoma cells. Endocrinology. 121 (1): 212-218, 1987.

