

## Sıçanlarda serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesine etkisi

Erol Göktürk<sup>(1)</sup>

*Çalışmada 30 adet sıçan serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesine olan etkilerini araştırmak için kullanıldı. Sıçanlar iki gruba ayrıldı ve sıçanların sağ önkolları manuel kompresyon yöntemi ile kırıldı. Kırıktan 1 saat önce 15 sıçana 5 ml/kg. ip. salin (kontrol grubu), 15 sıçana ise polimorfonükleer lökositlerdeki NADPH oksidaz'ı uyararak serbest oksijen radikalleri oluşturmak için zymosan 100 mg/kg. ip. olarak uygulandı. Bu uygulama günde bir defa olmak üzere sürdürüldü ve kırık sonrası 5. gün son verildi. Kırık sonrası 22. gün eter anestezisi altında tüm sıçanlar öldürüldü. Radius ve ulna'dan alınan histolojik kesitler incelendi. Zymosan verilen grupta kırık iyileşmesinin hızlandığı saptandı. Bu nedenle serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesinde önemli rolü olabileceği sonucuna varıldı.*

**Anahtar kelimeler:** Kırık iyileşmesi, serbest oksijen radikali, zymosan

### *The effect of free oxygen radicals on fracture healing in rats*

*Thirty male rats were used to study the effect of free oxygen radicals on fracture healing. The rats were divided into two groups and the right forelimbs of the rats were broken by light manual compression. One hour before the fracture the following treatments were given to groups of 15 animals; saline 5 ml/kg i.p. (control group) or zymosan 100 mg/kg i.p. to induce free oxygen radicals through stimulation of NADPH oxidase in polymorphonuclear leucocytes. Treatment were stopped on the fifth post-fracture day. All rats were sacrificed with high dose ether on day 22, and histological sections of the radius and ulna were examined without knowledge of the treatment regiment. The administration of zymosan impaired the fracture healing and therefore free oxygen radicals appear to play an important role on fracture healing.*

**Keywords:** Fracture healing, free oxygen radical, zymosan

Aerobik organizmalarda sürekli oluşan oldukça reaktif ve kısa ömürlü moleküller olan oksijen kaynaklı serbest radikaller, hücre içinde çeşitli metabolik bozukluklara yol açarak hücre hasarı ve sonunda hücre ölümüne neden olurlar. Günümüzde serbest radikallerin kanser ve yaşlanma dahil pek çok patolojik olayın ortaya çıkışında rolleri olduğuna ilişkin kanıtlar mevcuttur. İskemi-reperfüzyon zedelenmesi, stres ve ilaçlara bağlı gastrik mukozaya hasarındaki rolleri kesinleşmiştir. Bunun yanı sıra yara iyileşmesi, granülasyon dokusu, kollajen ve kıkırdak doku üzerine olan olumsuz etkileri de gösterilmiştir (5, 11, 12, 17).

Ksenobiyotiklerin verilmesi ve bakteriler epitelyal ya da inflamatuvar hücreleri uyararak birçok dokuda serbest oksijen radikallerinin oluşumuna yol açarlar (21, 23). Grret ve ark'ları (14) serbest oksijen radikallerinin osteoklastların formasyon ve aktivasyonundaki rollerini gösterdiler.

Serbest oksijen radikallerinin oluş mekanizması iyi bilinmekle birlikte, bizim bilgilerimize göre bunların kırık iyileşmesine olan etkilerinin araştırıldığı yayınlanmış bir çalışma yoktur. Çalışmanın amacı, sıçanlarda serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesine olan etkilerini araştırmaktır.

### Gereç ve yöntem

Çalışmada ağırlıkları 200-300 gram olan Sprague-Dawley cinsi 30 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar herbirinde 15 adet olmak üzere kontrol ve zymosan gruplarına randomize olarak ayrıldı. Kontrol ve zymosan gruplarındaki sıçanların ortalama ağırlıkları sırasıyla 248 gram ve 233 gram olarak saptandı. Herbir sıçan bağımsız kafeslerde tutuldu. Su ve standart diyet almalarına izin verildi.

Eter ile anestezisi sağlandıktan sonra sıçanların sağ önkolları Allen ve ark.'ları (1)'nin tanımladığı manuel kompresyon yöntemi ile kırıldı. Kırık oluşturulduktan hemen sonra, sıçanlar henüz anestezisi altında iken çekilen radyografilerde radius ve ulnadaki kırığın basit transvers kırık olduğu saptandı.

Kırıktan 1 saat önce ve hergün bir defa olmak üzere kontrol grubundaki sıçanlara 5 ml/kg i.p. salin, deney grubundaki sıçanlara ise zymosan 100 mg/kg. i.p. (Sigma Chemical Co.) olarak uygulandı. Zymosan polimorfonükleer lökositlerde NADPH oksidaz'ın uyarılarak serbest oksijen radikalleri oluşturmak için verildi (11, 12). Bu uygulamalara kırık sonrası 5. günde son verildi. Sıçanların izlenmesi sırasında herhangi bir komplikasyon görülmedi. Sıçanların çalışmada sonundaki ağırlıkları arasında farklılık saptanmadı.

Kırık sonrası 7, 14 ve 21. günlerde her iki gruptaki sıçanlara eter ile anestezisi sağlanıp kırıkların radyografileri çekildi. Seri radyografiler çalışmanın sonlandırma süresini saptamak için elde edildi. Kontrol grubundaki sıçanların kırıklarında radyografik olarak

(1) Orhangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Prof. Dr.

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

Tablo 1: Kırık iyileşme skorları. Grading sistem.

mineralize köprüleşme saptanınca sıçanlar yüksek dozlarda eter ile öldürüldü ve kırık sonrası 22. günde otopsi yapıldı. Otopsi dirsek ve elbilekleri arasında kırık radius ve ulnayı kapsıyordu. Elde edilen doku %10'luk nötral buffered formalin'de fikse edildi.

Önkol kemikleri %15 aköz formik asid içinde dekalsifiye edildi. Her bir kallus dokusunun merkezinden 6 mm kesitler halinde parafin bloklar hazırlandı (1). Tüm histolojik kesitler hematoksilin ve eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Kırıklardaki iyileşme yaklaşık 50 kesit incelenerek saptandı. İyileşmenin histolojik derecelendirilmesi 5-grade sistemine göre yapıldı (1) (Tablo 1). İyileşmenin derecelendirilmesinde en az iyileşen kemik (radius ya da ulna) kırığı dikkate alındı. Kesitlerde teknik nedenlerle düzensizlik saptandığı durumlarda her iki kırık kallus kesitleri birlikte değerlendirilerek derecelendirme yapıldı (1). Gruplar arası kıyaslama Ki-Kare ve t-testleri ile yapıldı.

## Bulgular

Kontrol grubundaki tüm kırıklarda kırık sonrası elde edilen radyografilerde iyileşme saptandı. Histopatolojik olarak, kontrol grubundaki tüm kırıklarda inkomplet kemiksel kaynama (grade 3) saptandı. Zymosan verilen deney grubundaki kırıkların ise inkomplet kemiksel kaynama (n 9) ya da komplet kartilajinöz kaynama gösterdikleri belirlendi (Grade 2, n 6, p<0.01).

## Tartışma

Serbest radikal biyolojisi, son yıllarda üzerinde en çok durulan ve birçok yönleri ile araştırılan bir konudur. Bir serbest radikal 1, 3, 5, gibi tek sayıda elektronlara sahip herhangi bir molekül olarak tanımlanır. Hem organik, hem de inorganik moleküller halinde bulunurlar ve oldukça reaktif özellik taşırlar. İn vivo normal metabolizmanın ürünleri şeklinde açığa çıkan serbest radikaller ayrıca organizmanın iyonize edici radyasyona, oksitleyici özellik oluşturabilen ksenobiyotiklere maruz kaldıkları durumlarda da meydana gelebilir. Canlılığın devamının zorunlu bir parçası olan oksijen serbest radikalleri sayısız enzimatik tepkime ve biyolojik fonksiyonlar için gereklidirler. Ancak her bir radikalın yapısı ve etkili olduğu yere göre hücresele hedefler risk altındadır. Bu bakımdan serbest radikallerin hücresele kaynakları, rol oynadıkları tepkimeler ve hücresele savunmalarla adaptif mekanizmaların incelenmesi henüz açıklık getirilmemiş bazı klinik durumların patogenezinine ışık tutabilir (4, 24).

Aerobik organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Oksijenin reduksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit radikal ( $O_2^-$ ) açığa çıkar. Bu radikalın kendiliğinden ya da enzimatik dismutasyon reaksiyonu ile,  $O_2 + O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ , ikinci bir ara ürün hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşur. Yine süperoksit radikalının yer aldığı bir dizi reaksiyon sonucu olan özellikle mitokondri içinde bir diğer serbest radikal hidroksil radikal (OH.) meydana gelir (4, 24).

Aerobik hücrelerde serbest oksijen radikal üretimi çeşitli şekillerde ortaya çıkabilir. Bunlar mitokondriden intrasellüler üretim, katekolaminlerin otooksidasyonu, ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüştürülmesi, aktive edilmiş nötrofillerden salınması ve arasıdonik asid kaskadı şeklinde özetlenebilir (19).

Serbest radikallerin kaynaklarıyla, çeşitli hücre ve dokulara olan zararlı etkileri iyi bilinmekle birlikte bizim bilgilerimize göre, kırık iyileşmesine etkisinin araştırıldığı çalışma yapılmamıştır. Serbest radikallerin kırık iyileşmesine etkisinin daha önce araştırılmamış olması, aseptik inflamasyonda serbest radikallerin ortama çıkışı, kas. ve tendon zedelenmesinde iskemi-reperfüzyon hasarının olduğunun bilinmesi, ayrıca serbest radikallerin yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilediğini bildiren yayınların bulunması bizi bu çalışmayı yapmaya yöneltti (11, 16, 20, 26).

İnflamasyon evresi kırık iyileşme aşamalarından birisi olup kırıktan sonraki ilk 5 günü kapsar. İnflamasyon tüm zedelenele dokularda görülen bir olaydır. Kemik kırılınca endosteum, periost ve çevredeki yumuşak dokuların parçalanması sonucu dokular arasına kan, lenf ve eksüda birikir. Kırık hematomu olarak adlandırılan bu birikinti kırık iyileşmesi için gerekli temel öğeleri içerir. Bu ilk aşama sonrası bölgedeki yumuşak dokularda vazodilatasyon, plazma lökosit eksüdasyonu gibi inflamasyon değişiklikleri gösterirler. Derhal polimorflar, histiositler ve mast hücreleri belirginleşirler. Kırık iyileşmesinin erken dönemi oldukça önemlidir. Çoğu biyolojik yetmezliğin nedeni kırıktan sonraki ilk haftalarda ortaya çıkar (8, 13, 22).

İnflamasyon sürecinde serbest oksijen radikallerinin arttığını bildiren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Greenwald ve ark.'ları (17) 1979'da vücut içinde lökositler tarafından üretilen serbest oksijen radikallerinin kırıkta ve çevresel eklem yapılarının yapısal veya fonksiyonel bütünlüğünü olumsuz yönde etkilediğini gösterdiler. Shandall ve ark.'ları (26) 1986'da dokudaki lokal hasar ya da cerrahi sonucu bölgeye gelen polimorfların serbest oksijen radikallerini reperfüzyon stimülasyonu ve inflamasyon etkisi ile arttığı sonucuna vardılar.

Kırık sadece kemik dokusunun travmatik hastalığı değil, aynı zamanda çevredeki kas, tendon gibi yumuşak dokuların zedelenele ile seyreden bir olaydır. Bu çevresel dokulardan olan kas ve tendonların hasarlanmasında zedelemeyi oluşturan unsurlardan birisinin de iskemi-reperfüzyon olduğuna bilinmektedir



(20). İskemi sırasında hücre içinde aerobik metabolizma hızla anaerobik metabolizmaya dönüşür. ATP, ADP gibi yüksek enerjili fosfatlar birikir. İskemi sırasında hücre içine kalsiyum girişinin artması endojen fosfolipazların aktive olmasına ve hücre membran bütünlüğünün bozulmasına neden olurlar. Ksantinoxidazın iskemiyle aktivasyonu, parankimal dokularda serbest radikal oluşumu için potansiyel mekanizmadır. Bazı deneysel çalışmalar sonucunda daha önceleri iskemik olduğu düşünülen hasarın reperfüzyon sırasında ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır (4, 19, 20, 25).

Kırık iyileşmesinin başlangıç dönemi yara iyileşmesine oldukça benzer. Bir yumuşak doku yarası ve kırıkta önce hemoraji gözlenir. Trombositlerden ve diğer trombotik etkenlerden salınan moleküler mediatörler her iki durumda da ayırudur. Ayrıca doku zedelenmesi sonucunda diğer bazı aktif mediatörler salınır. Tüm bu yapılar, kemoatranktanlar, angiogenetik ve büyüme faktörlerini oluştururlar, zedelenme bölgesine komşu dokulardan göç eden monositler ve makrofajlar da büyüme faktörleri oluştururlar. Trombositler trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi bir çok büyüme faktörünü içerir (6, 27). Polimorf hüvelü lökosit, makrofaj ve lenfosit gibi çeşitli kan hücreleri yara ya da kırık bölgesine gelirler. Her ne kadar kıyaslamalı çalışmalar yapılmamış olmakla birlikte büyük bir olasılıkla mezenkimal hücrelerin göçü yara iyileşmesi ve kırık onarımı için aynıdır (18).

Polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonu ile oluşan serbest oksijen radikallerinin yara iyileşmesi ve granülasyon dokusunu bozduğu bilinmektedir. Foschi ve ark.'ları (11, 12) serbest oksijen radikallerinin yara iyileşmesi ve granülasyon dokusuna etkilerini araştırdıkları çalışmalarında polimorfonükleer lökositlerde NADPH oksidaz'ın stimülasyonu ile serbest oksijen radikal oluşturmak için zymosan kullandılar. Zymosan'ı 5 gün süre ile 100 mg/kg olarak kullanan Foschi ve ark.'ları (11, 12) bu dozun patoloji durum ortaya çıkabilecek düzeyde serbest oksijen radikal oluşturduğunu gösterdiler.

Polimorfonükleer lökositler uygun bir stimulus ile karşılaştıklarında "respiratory burst" adı verilen metabolik değişiklik gösterirler. Polimorfonükleer lökositlerin "respiratory burst"ü aktive edebilir (7, 15, 21, 28, 29).

Zymosan, *Saccharomyces cerevisiae*'nın 3-5 mm'lik hücre duvarı fragmanı olup polisakkarid, protein ve lipidden oluşur (9, 10). Polisakkarid komponenti olan gluklan Zymosan'ın kuru ağırlığının %60'ını oluşturur. İkinci bir polisakkarid olan mannan ise Zymosan'ın %20'sini oluşturmaktadır. Polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonunda asıl komponent gluklan olmakla birlikte mannan da bu hücrelerde "respiratory burst"ün transmembran aktivasyonunda önemli rol oynar (20).

Yukarıdaki verilere dayanarak serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesini bozması beklenmelidir. Bununla birlikte bizim bilgilerimize göre bu konu üzerinde çalışılmamıştır. Kırık iyileşmesinin inf-

lamatuvar evresine rastlayan 5 günlük dönemde kullandığımız, Zymosan kırık iyileşmesini bozdu. Elde edilen bulgular serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesinde rolü olduğunu düşündürmektedir.

## Kaynaklar

- 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* 51: 595-600, 1980.
- Babior BM: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New Eng J Med* 298 (12): 659-668, 1978.
- Babior BM, Curnutte JT, McMurrich BJ: The particulate superoxide-forming system from human neutrophils. Properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst. *J Clin Invest* 88: 989-996, 1976.
- Bagchi D, Kas DK, Engelman R, et al: Polymorphonuclear Leucocytes as potential source of free radicals in the ischemic-reperfused myocardium. *Eur Heart J* 11: 800-813, 1990.
- Bulkley GB: The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 94: 407-411, 1983.
- Canalis E, McCharthy T, Centrella M: Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest* 81: 277-281, 1988.
- Cohen HJ, Chovaniec ME, Ellis SE: Chlorpromazine inhibition of granulocyte superoxide production. *Blood* 56 (1): 23-29, 1980.
- Cornell CN, Lane JM: Newest factors in fracture healing. *Clin Orthop* 277: 297-311, 1992.
- Di Carlo FJ, Fiore JV: On the composition of zymosan. *Science* 127: 756-757, 1957.
- Fitzpatrick FW, DiCarlo FJ: Zymosan. *Ann NY Acad Sci* 118 (4): 233-262, 1964.
- Foschi D, Trabucchi E, Musazzi M, et al: The effects of oxygen-free radicals on wound healing. *Int J Tissue React* 10 (6): 373-379, 1988.
- Foschi D, Castoldi L, Radelli E, et al: Hyaluronic acid prevents oxygen-free radical damage to granulation tissue. A study in rats. *Int J Tissue React* 12 (6): 333-339, 1990.
- Frost HM: The biology of fracture healing. An overview for clinicians. *Part II. Clin orthop* 248: 294-308, 1989.
- Garrett IR, Boyce BF, Oreffo ROC, et al: Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 85: 632-639, 1990.
- Goldstein IM, Roose D, Kaplan HB, et al: Complement and immunoglobulins stimulate superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis. *J Clin Invest* 56: 1155-1163, 1975.
- Göktürk E, Seber S, Özkaç H, ve ark. İskelet kası iskemisi reperfüzyon zedelenmesinde dimetil sulfoksit'in koruyucu etkisi. Tavşanlarda metabolik ve histopatolojik bir çalışma. *Anadolu Tıp Dergisi* 11: 173-189, 1989.
- Greenwald RA, Moy WW: Inhibition of collagen gelation by action of the superoxide radical. *Arthritis and Rheumatism* 22 (3): 251-259, 1979.
- Hulth A: Current concepts of fracture healing. *Clin Orthop* 249: 265-284, 1989.
- Ikeda Y, Long DM: The molecular basis of brain injury and brain edema. The role of oxygen-free radicals. *Neurosurgery* 27: 1-11, 1990.
- Korthuis RJ, Granger DN, Townsley MI: The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ Res* 57: 599-609, 1985.
- Maridonneau-Parini I, Tringale S, Tauber AI: Identification of distinct activation pathways of the human neutrophil NADPH-oxidase. *J Immunol* 137 (9): 2925-2929, 1986.
- Mc Kibbin: The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg* 60 (B): 150-162, 1978.

23. Nishikimi M, Rao NA, Yagi K: The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen *Biochem Biophys. Res Commun* 46: 849-854, 1972.

24. Özelçi (Kavas) G: Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri* 9: 1-8, 1989.

25. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, et al: Ischemic injury in the cat small intestine. Role of Superoxide radicals. *Gastroenterology* 82: 9-15, 1982.

26. Shandall AA, Williams GT, Hallett MB, et al: Colonic healing a role for polymorphonuclear Leucocytes and oxygen radical production. *Br. J Surg* 73: 225-228, 1986.

27. Simmons DJ: Fracture healing perspectives. *Clin Orthop* 200: 100-113, 1985.

28. Tauber AI, Gabig TG, Babior BM: Evidences for production of oxidizing radicals by the particulate O<sub>2</sub>-Forming system from human neutrophils. *Blood* 53 (4): 666-676, 1979.

29. Williams JD, Topley N, Alobaidi HM, et al: Activation of human polymorphonuclear leucocytes by particulate zymosan is related to both its major carbohydrate components. glucan and mannan. *Immunology* 58: 117-124, 1986.

*Yazışma adresi:*

*Prof. Dr. Erol Göktürk*  
*Orhangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi*  
*Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı*  
*26480 Meşelik, Eskişehir, Türkiye*