



The Effect of Acupuncture on Oxidative Stress in Rats with Femur Fractured

Seval YILMAZ¹ Emre KAYA¹ Ahmet KAVAKLI² Süleyman GÜRBÜZ³ Erhan YILMAZ³

¹ Firat University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Elazığ, Turkey

² Firat University, Faculty of Medicine, Department of Anatomy, Elazığ, Turkey

³ Firat University, Faculty of Medicine, Department of Orthopedics and Traumatology, Elazığ, Turkey

Received: 10.10.2018

Accepted: 08.03.2019

ABSTRACT

The effect of acupuncture which is one of alternative and complementary methods on fracture healing and free oxygen radicals was investigated. In this study, 54 female Wistar albino rats with 250-300 g BWs were randomly divided into 10 groups including, control group, sacrificed on days 7, 14 and 21 of acupuncture, sacrificed on days 7, 14 and 21 of fracture, and sacrificed on days 7, 14 and 21 of fracture + acupuncture application. The rats in the control group received no treatment. The 0.5 mm thick kirschner wire was advanced intramedullary as retrograde from the fracture line of the proximal part of the bone and fracture was performed. After fracture formation, acupuncture (50 Hz, 20 qA, 25 minutes) was applied to the rats. This treatment was applied for 7, 14 and 21 days as 4 sessions per week. The rats were sacrificed at 7, 14 and 21 days after fracture formation and plasma malondialdehyde (MDA), whole blood reduced glutathione (GSH) levels, erythrocyte catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activities were measured. Plasma MDA and GSH levels were statistically significant in all fracture groups compared to the control group ($P<0.05$). A statistically significant reduction was observed in the fracture + acupuncture groups compared to the fracture groups ($P<0.05$). While no statistically significant change was observed in blood CAT activities of the group sacrificed on 7th day of fracture compared to the control group, statistically significant decreases were observed in the groups sacrificed at 14th and 21th days of fracture compared to the control group. There were a statistically significant decreases in the blood SOD, GSH-Px and G6PD activities compared to the control group in fracture groups. CAT, SOD, GSH-Px and G6PD activities showed a significant increase in the fracture + acupuncture groups compared to the fracture groups ($P<0.05$). In conclusion, it can be said that the application of acupuncture can positively influences the fracture healing process of the fracture by suppressing the harmful effects of free oxygen radicals and regulating the activities of antioxidant enzyme activities.

Keywords: Acupuncture, Antioxidant enzyme, Glutathione, Fracture healing, Malondialdehyde

ÖZ

Femur Kırığı Oluşturulmuş Ratlarda Oksidatif Stres Üzerine Akupunkturun Etkisi

Alternatif ve komplementer tedavi yöntemlerinden olan akupunkturun kırık iyileşmesi ve serbest oksijen radikalleri üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmada, 250-300 g ağırlığında 54 adet dişi Wistar albino rat, kontrol grubu, 7, 14 ve 21. gün süreyle akupunktur uygulanan gruplar, kırık oluşumunun 7, 14 ve 21. günlerinde sakrifiye edilen gruplar ve 7, 14 ve 21 gün boyunca kırık+akupunktur uygulanan gruplar olmak üzere rastgele 10 gruba ayrıldı. Kontrol grubu ratlara tedavi uygulanmadı. Ratların femurlarında gigli testeresi ile transvers bir kırık hattı oluşturuldu. Kirschner teli kemiğin proksimal parçasının kırık hattından retrograd olarak intramedüller ilerletildi ve kırık tespiti yapıldı. Kırık oluşumunun ardından ratlara akupunktur (50 Hz, 20 qA, 25 dakika) uygulandı. Bu tedavi haftada 4 seans olacak şekilde 7, 14 ve 21 gün süre ile uygulandı. Ratlar kırık oluşturulmasından 7, 14 ve 21 gün sonra sakrifiye edilerek plazma malondialdehit (MDA), tam kan redükte glutatyon (GSH) seviyeleri, eritrosit katalaz (KAT), süperoksit dismütaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) aktiviteleri ölçüldü. Plazma MDA ve kan GSH düzeylerinde, tüm kırık gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artma saptandı ($P<0,05$). Kırık + akupunktur gruplarında kırık gruplarına göre istatistiksel olarak önemli ölçüde azalma gözlemlendi ($P<0,05$). Kan KAT aktivitelerinde 7. gün sakrifiye edilen kırık grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir değişiklik gözlenmezken, 14 ve 21. günlerde sakrifiye edilen kırık gruplarında kontrol grubuna göre önemli bir azalma saptandı. Kan SOD, GSH-Px ve G6PD aktiviteleri kırık gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir azalma saptandı ($P<0,05$). KAT, SOD, GSH-Px ve G6PD aktivitelerinde kırık + akupunktur gruplarında kırık gruplarına göre önemli bir artma gözlemlendi ($P<0,05$). Sonuç olarak akupunktur uygulamasının serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerini baskılayarak ve antioksidan enzim aktivitelerini düzenleyerek kırık iyileşme sürecini olumlu yönde etkilediği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Akupunktur, Antioksidan enzim, Glutatyon, Kırık iyileşmesi, Malondialdehid

GİRİŞ

Kırık iyileşmesi inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme aşamaları sonrasında travmatize kemiğin orijinal hale dönmesi olarak tanımlanmaktadır. Kırığın oluşması ile birlikte kırık iyileşmesi başlamakta, olgun ve organize kemik dokusu ile kemik uçları tamamen bir bütün oluncaya kadar devam etmektedir (Frost 1989).

Organizmada fizyolojik ve patolojik tüm metabolik işlemlerin yürütülmesi, yüzlerce enzim ve substratın katıldığı reaksiyonların düzenli ve hızlı bir şekilde sürdürülmesi ile mümkündür. Bu reaksiyonlar sırasında yararlı birçok ürünle birlikte, özellikle fazla miktarda oluştuğunda organizma için zararlı etkiler yapabilecek bileşikler de ortaya çıkmaktadır. Bunlardan en önemlileri serbest radikallerdir. Hücrelerin karbonhidrat, protein, lipid, DNA ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki eden serbest radikaller hücre hasarı ve hücre ölümüne yol açarlar (Göktürk 1997; Yılmaz ve Yılmaz 2006; Yılmaz ve ark. 2006).

Kemik iyileşmesine olumlu ya da olumsuz yönde etki eden pek çok lokal ve genel faktör bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, kemik iyileşmesi üzerine etkili olan faktörler arasında serbest radikallerin de bulunduğunu göstermektedir. Biyolojik etkileşimlerin en yoğun gözlemlendiği kırık iyileşmesinin erken döneminde serbest radikallerin meydana geldiğini ve bu radikallerin kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etkilerinin olduğunu belirten çalışmalar bulunmaktadır (McKibbin 1978; Frost 1989; Comeli ve Lane 1992; Göktürk 1997). Göktürk (1997), ön kollarını manüel kompresyon ile kırdığı sıçanlara polimorfonükleer lökositlerdeki nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidazı uyararak serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşturmak için zymosan uygulamış ve kırık iyileşmesinin bozulduğunu saptamıştır. Norazlina ve ark. (2002), serbest radikallerin osteoblastlar üzerinde toksik etki gösterip hücrenin foksionlarını durdurarak etki gösterdiğini ve SOR'nin kırık iyileşmesinde önemli rolleri olduğunu bildirmişlerdir.

Kırık iyileşmesinin erken dönemi oldukça önemlidir. Kırık oluşuktan hemen sonra inflamasyon evresi kırık oluşumundan sonraki ilk beş günü içerir ve hasar gören tüm dokularda meydana gelen bir olaydır. Kırık oluştuğunda endosteum, periost ve çevredeki yumuşak dokuların hasar görmesi ile dokular arasına kan, lenf ve eksudat birikir. Kırık hematomu şeklinde isimlendirilen bu birikinti kırık kemiğin onarılması için gerekli bütün temel öğeleri içerisinde barındırır (Greenwald ve Moy 1979). Kırığın iyileşmesi için çok önemli olan şey başlangıç fazında, inflamatuvar hücrelerin (lökosit, makrofaj ve mast hücreleri gibi) kırık bölgesine ulaşmasıdır (McKibbin 1978; Frost 1989; Comeli ve Lane 1992). Polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonu ile üretilen SOR'nin granülasyon dokusunu bozduğu ve yara iyileşmesini geciktirdiği bildirilmektedir (Seyama 1993; Göktürk 1997; Engle ve ark. 1998; Keskin ve ark. 1999).

Kırıklar ekstremiteyi iskemiyeye maruz bırakabilir. İskemik dokuların oksijenize kanla reperfüzyonu; hidroksil (OH⁻), süperoksit (O₂⁻), singlet oksijen (¹O₂), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve nitrik oksit (NO⁻) gibi SOR'nin aşırı üretimine ve bu SOR'nin kan dolaşımına dahil olmasına sebep olur (Cheeseman 1993; Turgut ve ark. 1999). Kırık hattının iyileşmesi esnasında fazla miktarda SOR meydana gelmekte ve inflamasyon evresini de içeren onbeşinci günde en yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Meydana gelen SOR düzeyindeki bu yükseliş, kırık iyileşmesini olumsuz

bir şekilde etkilemektedir (Göktürk ve ark. 1995; Yeler ve ark. 2005).

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı, hücre ve dokularda gelişmiş olan antioksidan moleküllerin çeşitliliğine, yaygın dağılımına ve oldukça etkili koruma sağlamalarına karşın, bazı durumlarda savunma sistemi yetersiz kalmakta ve makromoleküler hasar görülmektedir (Göktürk 1997; Turgut ve ark. 1999; Yılmaz ve Yılmaz 2006; Yılmaz ve ark. 2006). Endojen antioksidanların yetersiz kaldığı, serbest radikallerin çok fazla üretildiği kırıkta, akupunktur gibi birçok hastalıkta olumlu etkisinin olduğu ispat edilmiş olan detoksifikasyon sürecine katkıda bulunabilecek doğal yöntemlerin etkileri araştırılmıştır (Adrian 2012).

Akupunktur, sinirlerin uyarılması amacıyla vücuttaki belirli özel noktalara iğnelerin batırılması ile yapılan tedavi şeklidir. Belirli bu özel akupunktur noktaları canlıda meydana gelen biyokimyasal ve fizyolojik reaksiyonları artırabilecek kabiliyete sahiptirler. Akupunktur, canlı organizmanın kendisini tedavi ettiği bir yöntem olup, en önemli özelliği ise herhangi bir yan etkisinin bulunmamasıdır (Adrian 2012; Gao ve ark. 2017). Özel akupunktur noktalarının bu yöntem ile uyarılmasıyla; akupunktur yapılan bölgede kan dolaşımının fazlalaşması, inflamasyonun düşmesi, morfin benzeri etki gösteren endorfin hormonunun salgılanması, kas sertliğinin geçmesi, yüksek olan kan basıncının düşmesi, cildin ve müköz membranların çeşitli faktörlere karşı aşırı duyarlılığının azalması, immün yanıtta ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı dirençte artış, sekonder bir mekanizma ile lipolizisin uyarılması, hipnotik etki gibi bazı özel etkiler meydana gelmektedir. Akupunktur noktaları uyarılınca, bu noktadan başlayan hücresel uyarılar sinirsel iletim vasıtasıyla beyine ulaşır, buradan da ilgili organlar uyarılır. Bunun sonucunda canlı vücudunda var olan kimyasal maddeler, enzimler, hormonlar salgılanmakta ve birtakım hücresel değişiklikler meydana gelmektedir (Hunter 2011; Acosta-Olivo ve ark. 2017). Akupunktur uygulaması ile başta romatizmal rahatsızlıklar olmak üzere, nörolojik, ruhsal, hormonal, solunum yolu, deri, ağız hastalıkları, üriner ve genital sistem, mide-bağırsak sistemi, kardiyovasküler sistem ve göz rahatsızlıkları gibi hemen hemen tıbbın her alanında tedavi uygulamaya uygun olduğu ve akupunktur uygulaması ile bu rahatsızlıkların iyileştirilebildiği belirtilmiştir (Schulman 2001).

Çalışmada; kırık iyileşme sürecinde akupunktur uygulamasının malondialdehit (MDA), redükte glutatyon (GSH) düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada 3 aylık toplam 54 adet Wistar-Albino ırkı dişi rat (250-300 gr ağırlığında) kullanıldı. Araştırmaya başlamadan önce Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan araştırma için etik kurul izni (2011/07-92) alındı ve deney hayvanları Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edildi. Deneysel uygulamalar laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı şartlarına (12 saat aydınlık: 12 saat karanlık ve 24±3°C) göre gerçekleştirildi. Deneysel uygulamalar boyunca ratlara standart ticari rat yemi (pelet yem) ve musluk suyu *ad libitum* sağlandı. Ratlar, kontrol ve deney grupları olarak toplam 10 gruba ayrıldı. Gruplar; kontrol grubu (grup I), akupunktur uygulamasının 7. gününde kesilen grup (grup II), akupunktur uygulamasının 14.

gününde kesilen grup (grup III), akupunktur uygulamasının 21. gününde kesilen grup (grup IV), kırık oluşumunun 7. gününde kesilen grup (grup V), kırık oluşumunun 14. gününde kesilen grup (grup VI), kırık oluşumunun 21. gününde kesilen grup (grup VI), kırık oluşturulup akupunktur uygulamasının 7. gününde kesilen grup (grup VIII), kırık oluşturulup akupunktur uygulamasının 14. gününde kesilen grup (grup IX), kırık oluşturulup akupunktur uygulamasının 21. gününde kesilen grup (grup X)'tur.

Ratların sol femurlarında kırık oluşturuldu. Deneklere deneyin başlangıcında intraperitoneal olarak genel anestezi (Ketamin (Ketalar®) 50 mg/kg ve Xylazine (Rompun®) 10 mg/kg) uygulandı. Genel anestezi altında

tüm ratların sol femurları üzerinde 2,5 cm uzunluğunda anterolateral cilt insizyonu gerçekleştirildi. Femurun orta diafizer bölgesine ulaşarak gigli testeresi kullanılarak orta shaft kısmında enine kırık oluşturuldu. 0,5 mm kalınlığındaki kirschner teli kemiğin proksimal parçasının kırık hattından retrograd olarak intramedüller olarak ilerletildi. Femurun üst ucundan çıkarılan kirschner teli aynı şekilde intramedüller olarak distal kırık parçasına ilerletilip kırık tespiti yapıldı. Deney boyunca ratlara herhangi bir şekilde aktivite kısıtlaması yapılmadı ve girişim yapılan bacağa yük uygulamasına izin verildi. Kırık oluşumu direkt radyograflerle radyolojik olarak doğrulandı.

Tablo 1. Deney grupları

Table 1. Experimental groups

Gruplar	Uygulamalar
	Grup I Kontrol grubu (n:5)
Akupunktur Grupları	Grup II Akupunktur uygulamasının 7. gününde kesilen grup (n:5)
	Grup III Akupunktur uygulamasının 14. gününde kesilen grup (n:5)
	Grup IV Akupunktur uygulamasının 21. gününde kesilen grup (n:5)
	Grup V Kırık oluşumunun 7. gününde kesilen grup (n:6)
Kırık Grupları	Grup VI Kırık oluşumunun 14. gününde kesilen grup (n:6)
	Grup VII Kırık oluşumunun 21. gününde kesilen grup (n:6)
	Grup VIII Kırık oluşturulup Akupunktur uygulamasının 7. gününde kesilen grup (n:6)
Kırık+Akup. Grupları	Grup IX Kırık oluşturulup Akupunktur uygulamasının 14. gününde kesilen grup (n:5)
	Grup X Kırık oluşturulup Akupunktur uygulamasının 21. gününde kesilen grup (n:5)



Şekil 1. Akupunktur uygulaması

Figure 1. Acupuncture application

Kırık oluşumunun ardından ratlara elektroakupunktur (Elakupunktur Cihazı; 6 kanallı, ES-160 model, ITO CO LTD, 3-3-3 Toyotama-minami, JAPAN) uygulaması hem cerrahi alan civarına hem de uzak akupunktur noktalarına yapıldı. Cerrahi alanın 15 mm proksimal ve distaline birer iğne yerleştirildi. Uzak nokta olarak St 36 (tuberositas tibia'nın distal kenarı hizasında ve lateralinde, fibula ile tibia arasında), Li 4 (ön ayakların dorsumunda 1. ile 2. parmaklar arasında), Sp 6 (arka ayaklar tibia distal ucunun medial tarafında), Liv 7 (tibia medial kondilinin distalinde meidalde) ve Liv 3 (arka ayaklar dorsumunda 1. ve 2. parmakları arasında) noktaları iğnelendi. Cihazdan çıkan

uçlar aynı taraf akupunktur noktalarına ve cerrahi alanın proksimaline ve distaline gelecek şekilde uygulanmış iğnelere bağlanarak 50 Hz, 20 µA, 25 dakika, haftada 4 seans olacak şekilde 7, 14 ve 21 gün süre ile gruplara ayrı ayrı elektroakupunktur uygulandı (Şekil 1).

Kırık oluşturulmasından 7, 14 ve 21 gün sonra ratlar sakrifiye edilerek kan örnekleri alındı. Kan örnekleri etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren tüplerde toplandı ve +4°C'de 3.000 rpm'de plazmalarını ayırmak için 10 dk santrifüj edildi. Plazma MDA, tam kan ise GSH ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) tayini için kullanıldı. Plazması ayrılan EDTA'lı kan örnekleri, serum fizyolojik ile 3 kez yıkandıktan sonra eritrositlerde katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) aktiviteleri ve hemoglobin düzeyleri belirlendi. Plazma örneklerinde MDA düzeylerinde oluşan değişimler spektrofotometrik olarak Placer ve ark. (1966)'dan modifye edilen yöntemle ölçüldü. Bu yöntem LPO'nun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA)'in reaksiyonu temelinde dayanmaktadır. GSH tayini Ellman (1959) tarafından bildirilen metotla yapıldı. Bu yöntem, 5,5'dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ilave edildiğinde sülfidril gruplarının oldukça stabil sarı renk meydana getirmesi temelinde dayanan spektrofotometrik bir yöntemdir. KAT aktivitesini ölçmek için Aebi metodu (1974) kullanıldı. KAT, H₂O₂'in yıkımını katalize eder. H₂O₂'in KAT tarafından yıkılma hızı, spektrofotometrik olarak 240 nm dalga boyunda H₂O₂'in ışığı absorbe etmesinden faydalanılarak belirlendi. SOD aktivitesi Sun ve ark. (1988)'nin modifye etikleri metoda göre tayin edildi. SOD aktivite ölçümü, ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen O₂'nin nitroblue tetrazolium (NBT)'ü indirgeyerek renk oluşması esasına dayanan metod ile ölçüldü. GSH-Px ve G6PD

aktivitesi ölçümü için Beutler metodu (1975) kullanıldı. GSH-Px, GSH'un okside glutatyon (GSSG)'a oksidasyonunu H_2O_2 kullanarak katalizler. GSSG'ün oluşum hızı glutatyon redüktaz reaksiyonu vasıtasıyla ölçülür. Hemogloblin düzeyi tayininde Frankel ve ark. (1970)'nın metodu kullanıldı. Buna göre ferrisiyanür hemoglobindeki Fe^{+2} 'yi oksitleyerek $+2$ değerden $+3$ değerli demire çevirir, methemoglobine dönüşmesini sağlar. Bunu takiben potasyum siyanid ile stabil bir pigment olan siyanomethemoglobin meydana gelir. Siyanomethemoglobinin absorbanası 546 nm 'de okunur.

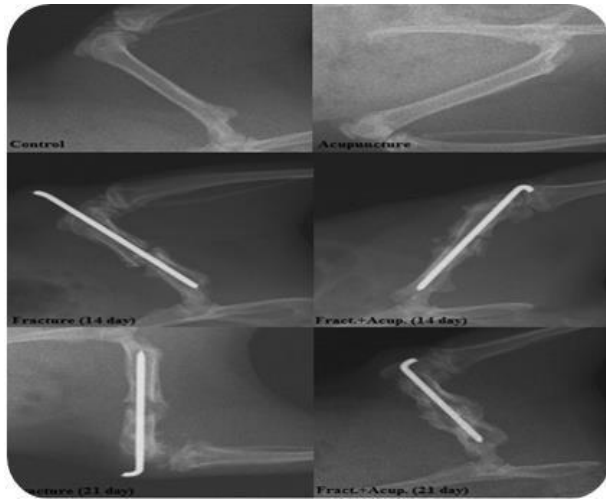
İstatistiksel Analiz

Ölçülen tüm parametrelere ait ham değerlerin normal dağılım gösterip göstermediklerini belirlemek için Shapiro-Wilk normallik testi uygulandı ve testin sonucunda tüm parametrelerdeki değerlerin normal dağılım gösterdiği tespit edildi. Gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve anlamlılığın görüldüğü durumlarda, farkın hangi gruptan/gruplardan kaynaklandığını saptamak için de *post hoc* Tukey testi uygulandı.

Yapılan tüm istatistiksel analizlerde SPSS 22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) yazılım paketi kullanıldı. Çalışma sonucunda elde edilen veriler ortalama ve standart hata olarak ifade edildi. $P < 0,05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

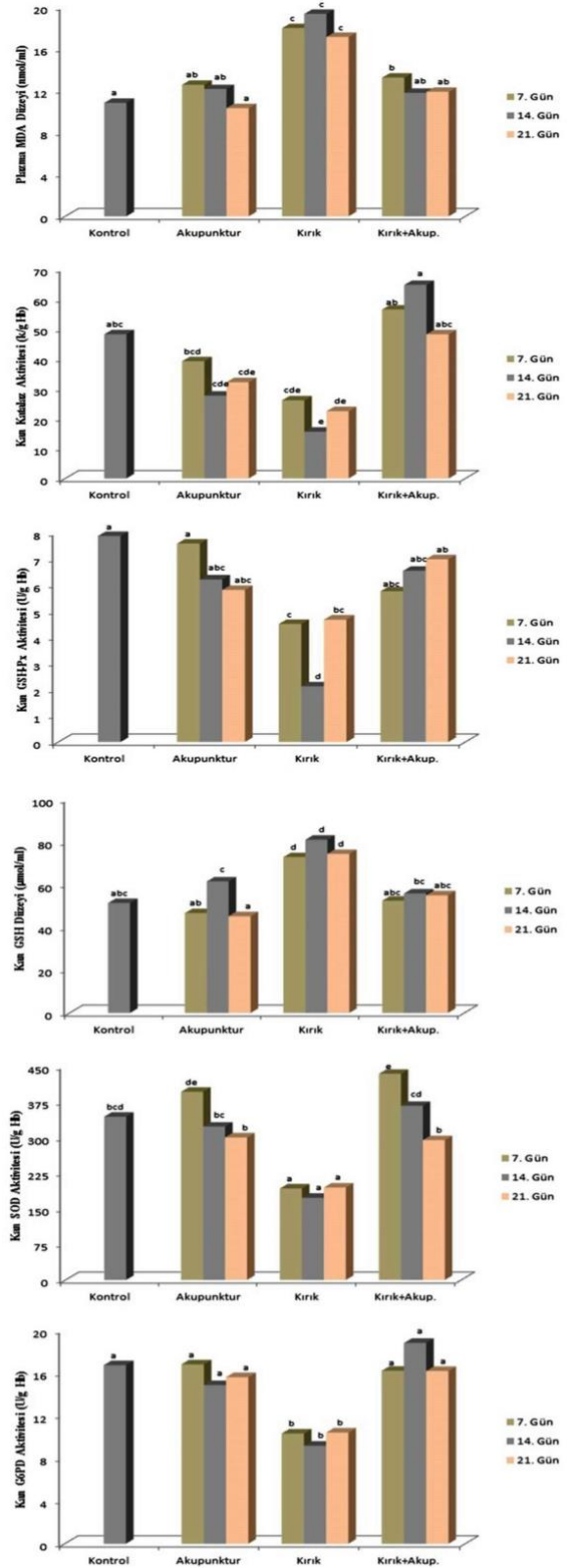
Ratlar herhangi bir komplikasyon olmadan ameliyat sonrası iyileştiler ve herhangi bir rahatsızlık belirtisi göstermediler. Tüm kırık gruplarında kırık sonrası elde edilen radyografilerde iyileşme saptandı (Şekil 2).



Şekil 2. Kırık iyileşmesinde radyolojik değerlendirme: Kontrol, akupunktur, kırık, kırık+akupunktur (14. ve 21. günler)

Figure 2. Radiological evaluation of fracture healing: Control, acupuncture, fracture, fracture+acupuncture (days 14 and 21)

Plazma MDA, tam kan GSH düzeyleri, eritrosit KAT, SOD, GSH-Px ve G6PD aktiviteleri Şekil 3'de verildi. Plazma MDA ve tam kan GSH düzeylerinde akupunktur gruplarında (7, 14, 21. gün) kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir değişiklik gözlenmedi. Plazma MDA ve tam kan GSH düzeylerinde tüm kırık gruplarında (7, 14, 21. gün) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede artma saptandı ($P < 0,05$). Kırık+akupunktur gruplarında kırık gruplarına göre istatistiksel olarak önemli ölçüde azalma gözlemlendi ($P < 0,05$).



a, b, c, d, e, Aynı grafikte farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir

Şekil 3. Kırık oluşturulan ratlarda akupunkturun MDA, GSH düzeyleri ile KAT, SOD, GSH-Px ve G6PD aktiviteleri üzerine etkileri

Figure 3. Effects of acupuncture on MDA, GSH levels, CAT, SOD, GSH-Px and G6PD activities in fractured rats

Eritrosit KAT, SOD, GSH-Px ve G6PD aktiviteleri kontrolle karşılaştırıldığında, akupunktur gruplarında (7, 14, 21.

gün) istatistiksel olarak önemli bir değişiklik göstermedi. Eritrosit KAT aktivitelerinde 7. gün sakrifiye edilen kırık grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir değişiklik gözlenmezken, 14 ve 21. günlerde sakrifiye edilen kırık gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir azalma saptandı ($P<0.05$). Eritrosit SOD, GSH-Px ve G6PD aktivitelerinde kırık gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir azalma saptandı. Eritrosit SOD, GSH-Px ve G6PD aktivitelerinde kırık+akupunktur gruplarında kırık gruplarına göre önemli bir artma gözlemlendi ($P<0.05$).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kırık iyileşmesini etkileyen faktörler ve iyileşmenin hızlandırılması araştırmacıların üzerinde çalıştığı popüler konularından biridir. Hayvan modellerinden elde edilen sonuçların insanlara uyarlanabilmesi çok önemlidir. İnsanlarda kırık iyileşmesinin erken dönemleri incelendiğinde, diyafiz kırıklarında görülen onarım hızı ile deneysel kırığın onarım hızı benzerlikler göstermiştir (Huo ve Troiano 1991). Bu nedenle, deneysel kırık modelinden elde edilen sonuçların insanlara uyarlanabileceği düşünülmektedir.

Kırık iyileşmesinin inflamasyon evresinde SOR'nin arttığını bildiren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Shandall ve ark. (1986) dokudaki lokal hasar ya da cerrahi sonucu bölgeye gelen polimorfların reperfüzyon stimülasyonu ve inflamasyon etkisi ile SOR'ni artırdığı sonucuna varmışlardır. Greenwald ve ark. (1979) vücut içinde lökositler tarafından üretilen SOR'nin kırıkta ve çevresel eklem yapılarının yapısal veya fonksiyonel bütünlüğünü olumsuz yönde etkilediğini göstermişlerdir. Basu ve ark. (2001), Cohen ve Meyer (1993) ve Leveille ve ark. (1997), oksidatif stresin artışıyla kemik dansitesindeki azalma arasında ilişki bulunduğunu bildirmişlerdir.

Vasküler yaralanmalar ve kompartman sendromunun eşlik ettiği kırıklarda, ekstremitelerde belirli bir süre iskemiyeye maruz kalmakta ve iskemi süresi sonlandıktan sonra reperfüzyon gerçekleşmektedir. İskemik durumlarda temel amaç, erken reperfüzyonu sağlayarak kas nekrozunu önlemektir (Wang ve ark. 2005). İskemi sonrası doku hasarı, çoğunlukla reperfüzyon sırasında oluşur (Toledo-Pereyra ve ark. 2004). Reperfüzyon, iskemik dokularda nötrofillerin birikimine ve endotel hücrelerinde ksantin oksidaz aktivitesinin artmasına neden olur ki, bu olaylar, O_2^- , H_2O_2 ve OH-olarak bilinen SOR'nin hızlı bir şekilde üretimine yol açar (Seyama 1993; Toledo-Pereyra ve ark. 2004; Wang ve ark. 2005). Geçici iskemi ve reperfüzyonun eşlik ettiği tibia kırıklarında oluşan SOR miktarının, kırık iyileşmesinin inflamasyon evresinde oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (Cetinus ve ark. 2005). Serin ve ark. (1998), ratlarda yaptıkları bir çalışmada, iskemi ve iskemi-reperfüzyon hasarında serbest radikaller ve bu hasara karşı vücutta koruyucu bazı değişikliklerin oluştuğunu ve bu değişikliklerden kan, kemik ve kas dokuları içerisinde en az etkilenen dokunun kas dokusu olduğunu bildirmişlerdir. Durak ve ark. (1996), femurlarını kırıkta tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında; SOR'nin etkilerinin kırık hematoma sıvısında plazmadan daha belirgin olduğunu bildirmişlerdir. Buna kırık bölgesinde gelişen ve SOR üretimi ve lipid peroksidasyon artışı ile sonuçlanan iskemi ve reperfüzyonun sebep olduğunu ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda plazma MDA düzeyinin kırığın 7. günden başlayarak arttığı saptanmıştır. MDA düzeyinin artması, kırık iyileşmesini olumsuz olarak etkilemektedir. Lipid peroksidasyonunun osteoklastları direkt olarak aktive ederek kemik rezorpsiyonunu artırdığı

bildirilmektedir (Garrett ve ark. 1990; Suda 1991). Bu nedenle, lipid peroksidasyonunun kırık iyileşmesini olumsuz etkileyebildiği, bunun da yüksek seviyede SOR ve düşük seviyedeki antioksidanların etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Kırık (7, 14 ve 21. günlerde), lipid peroksidasyonunda ve endojen antioksidan bir bileşik olan GSH düzeyinde önemli artışa neden olmuştur. GSH'un GSSG'a dönüşümünü katalizleyen antioksidan bir enzim olan GSH-Px aktivitesindeki azalma GSH'un GSSG'a dönüşümünü engellemiş olabilir. GSH, sayısız elektrofilik ve oksitleyici bileşiklerle etkileşim kurarak hem nükleofil hem de etkili indirgeyici görevi gören başlıca hücresel -SH bileşimidir. -SH grubunun SOR ile doğrudan etkileşimi ile nonenzimatik bir antioksidan görevi yapabilir veya bir koenzim olarak SOR için enzimatik detoksifikasyon reaksiyonunda yer alabilir (Göktürk 1997; Harmankaya ve Özcan 2017).

Vücutta her şey düzenli çalışırsa, düşük düzeyde ortaya çıkan SOR antioksidan enzimlerle etkisiz kılınır. Bunların üretimleri organizmanın temizleme olanaklarını aştığında dokuda yıkım başlamaktadır (McCord 1985; Göktürk 1997; Yılmaz ve Yılmaz 2006; Yılmaz ve ark. 2006; Yılmaz ve ark. 2014). Çalışmamızda, kırık gruplarında kan KAT, SOD, GSH-Px ve G6PD aktiviteleri düşük bulunmuştur. Avitabile ve ark. (1996), antioksidan sistemin düşük aktivitesi ve kemik demineralizasyonu ile serbest radikal düzeyindeki artış arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Osteoklast hücreleri, kemik rezorpsiyonu süresince SOR ve özellikle O_2^- anyonları ürettikleri ve bu anyonların, kemik yıkımına önemli bir katkısı olduğu gösterilmiştir (Collin-Osdoby ve ark. 1998). Kemik rezorpsiyonu O_2^- anyonlarını temizleyici bir enzim olan SOD ile engellenmektedir. Halıcı ve ark. (2010), plak eğme cihazı kullanarak ratların sağ tibianın distal 1/3'ünde kırık oluşturmuş ve sonra deneyin sonuna kadar intraperitoneal yolla 30 mg/kg/gün melatonin vermişlerdir. Plazma MDA seviyesinin kırık oluşturulan ratlarda 3, 7, 14 ve 28. günlerde kontrol değerlerine göre yüksek, kırık oluşumu ile birlikte melatonin uygulanan ratlarda ise düşük olduğunu bildirmişlerdir. Kanda SOD aktivitesinin melatonin uygulanmayan grupta 3, 7 ve 14. günlerde düşük olmasına rağmen, 28. günde ilk günkü değerine ulaştığını, miyeloperoksidaz seviyesinin ise 1, 3. ve 7. günlerde azaldığını bildirmişlerdir.

Kırık iyileşmesini hızlandırmak için birçok yazar farklı kimyasal ajanları kullanarak in vitro ve in vivo ortamlarda çalışmalar yapmıştır. Histing ve ark. (2011), sıçanlar üzerinde yapmış oldukları deneysel çalışmada, sildenafilin siklik guanozin monofosfat fosfodiesteraz 5'i inhibe ederek kırık iyileşmesini hızlandırdığını göstermişlerdir. Spiro ve ark. (2013), deneysel sıçan çalışmasında selektif östrojen modulatorü olan raloksifenin kırık iyileşmesinin erken fazlarında katkısı olduğunu göstermişlerdir. Bukata (2011), teriparatidinin kırık kallus oluşumunu ve kırık iyileşmesini hızlandırdığını bildirmiştir. Çift kör prospektif çalışmalarda elektromanyetik uyarımın femoral ve tibial osteotomilerin iyileşimine pozitif etkileri olduğu Mammi ve ark. (1993) tarafından gösterilmiştir. Ekstremitelerde uzatması yapılan 13 hastayı içeren bir çift kör çalışmada, Eyres ve ark. (1996) elektromanyetik uyarımın kemik iyileşmesi üzerine etkisi olmadığını bulmuşlardır; bununla birlikte 12 aylık takipte elektromanyetik uyarım uygulanan hastalarda distraksiyon hattının distalindeki kortikal kemikte daha az osteopeni olduğunu bildirmişlerdir. Claes ve ark. (2017), ratlarda yumuşak doku travmasının kırık iyileşmesi üzerine etkisini inceledikleri çalışmada, bölgede revaskülarizasyonun gecikmesi sonucu kan akımının azalmasına bağlı olarak

kallus oluşumunun bozulacağı ve kırık iyileşmesinin gecikeceği sonucuna varmışlardır.

Elektrik stimülasyonunun kırık bölgesine doğrudan uygulanması kemik kaynamasını sağlamak için kullanılan çok etkili bir yöntemdir. Yapılan bir çalışmada, ratlarda tibia kırığı iyileşme süreci üzerinde akupunkturun etkileri incelenmiştir. 12 haftalık erkek Wistar ratların tibialarına tek taraflı açık osteotomi uygulanmıştır. Akupunktur grubuna cerrahi bölgesine ve proksimaline 3 hafta boyunca günlük akupunktur uygulaması (50 Hz, 20 uA, 20 dakika) yapılmıştır. Ameliyat sonrası 1, 3, 4 ve 6. haftalarda radyografik, makroskopik ve mekanik muayeneler ile yanıt değerlendirilmiştir. Akupunktur, mekanik testte 6. haftada mükemmel bir sonuç göstermiştir. Akupunktur uygulaması ile tedavi süresinin daha kısa ve hareket fonksiyonlarının çok daha iyi olduğu rapor edilmiştir (Nakajima ve ark. 2010). Sonuçlarımız, akupunkturun MDA yükselmesini önemli ölçüde inhibe ederek kontrol seviyelerine geri döndüğünü göstermektedir. Akupunkturun serbest radikaller üzerine etkisi SOD, KAT, GSH-Px ve G6PD'nin salınımına yönelik uyarıcı etkisine atfedilebilir. Akupunktur uygulaması kemik iyileşme sürecinde kallus gelişimi ve kemik mineralizasyonunu artırmıştır.

Yapılan bir başka çalışmada, ulna kemik kırıklarında akupunktur noktalarından altın tel implantasyonu uzun vadeli stimülasyona yol açarak akupunkturun etkilerini uzatmak için ampirik olarak kullanılmıştır. Akupunktur noktalarında subkutan altın tel implantasyonunun sıçan ulna kemik defektinde kemik rejenerasyonu üzerine uzun vadeli etkileri olduğu gösterilmiştir (Kim ve ark. 2009). Gecikmiş kaynama ve kaynamama üzerine endüktans kancası ile birlikte akupunkturun tedavi edici etkisi araştırılmış, endüktans kancası ile birlikte akupunkturun kırık iyileşmesini teşvik etmek için iyi bir yöntem olduğu ileri sürülmüştür (Li ve ark. 2008). Kansere bağlı kemik ağrısının giderilmesinde akupunkturun etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada, akupunkturun ağrının giderilmesine yardımcı olabileceği ve zararlı yan etkilerinin bulunmadığı belirtilmiştir (Paley ve ark. 2011). Frantz ve ark. (2017), farelerde pentilentetrazol ile serebral kortekste meydana getirdikleri oksidatif stres ve inflamasyonda akupunkturun etkilerini inceledikleri çalışmalarında, akupunkturun potansiyel anti-epileptojenik etki göstermediğini, buna rağmen antioksidan ve anti-enflamatuar etkilerden kaynaklanabilecek nöronal korumayı büyük ölçüde desteklediğini göstermişlerdir.

Çalışmada kırık oluşumu lipid peroksidasyonun artmasına, antioksidan enzim aktivitelerinin ise azalmasına sebep olmuştur. Kırık bölgesine akupunktur uygulaması ise lipid peroksidasyonunu düşürmüş, antioksidan enzim aktivitelerini artırmıştır. Elde edilen bulgular SOR'nin kırık iyileşmesinde rolü olduğunu düşündürmektedir. Kırık oluştuktan hemen sonra son zamanlarda sık kullanılan doğal yöntemlerden akupunkturun uygulaması ile kırık iyileşme süreci kısaltılabilecek etkilerinin olacağı ve kullanılan ilaçlardan ileri gelebilecek yan etkilerin azaltılabileceği kanısına varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Fırat Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından VF.12.12 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Acosta-Olivo C, Siller-Adame A, Tamez-Mata Y, Vilchez-Cavazos F, Peña-Martinez V (2017). Laser Treatment on Acupuncture Points Improves Pain and Wrist Functionality in Patients Undergoing Rehabilitation Therapy after Wrist Bone Fracture. A Randomized, Controlled, Blinded Study. *Acupunct Electrother Res*, 42(1), 11-25.
- Adrian W (2012). Acupuncture in Medicine. BMJ Group Subscriptions Department, Northwich, Cheshire.
- Aebi H (1974). Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. Methods of enzymatic analysis. 2nd English ed. Weinheim: Verlag Chemie; 673-678.
- Avitabile M, Rasa R, Campagna NE, et al. (1996). Calcium release from the mineral matrix of the mandibular bone due to hydrogen peroxide exposure. *Minerva Stomatol*, 45, 401-403.
- Basu S, Michaelsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H (2001). Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun*, 288, 275-279.
- Beutler E (1975). Red cell metabolism. In: A manual of biochemical methods. 67-69, New York: Grune Strottan.
- Bukata SV (2011). Systemic administration of pharmacological agents and bone repair: What can we expect. *Injury*, 42, 605-608.
- Cetinus E, Kiliç M, Uzel M, et al. (2005). Does long-term ischemia affect the oxidant status during fracture healing? *Arch Orthop Trauma Surg*, 125, 376-380.
- Cheeseman KH (1993). Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspects Med*, 14, 191-197.
- Claes L, Gebhard F, Ignatius A, et al. (2017). The effect of a combined thoracic and soft-tissue trauma on blood flow and tissue formation in fracture healing in rats. *Arch Orthop Trauma Surg*, 137(7), 945-952.
- Cohen ME, Meyer DM (1993). Effects of dietary vitamin E supplementation and rotational stress on alveolar bone loss in rice rats. *Arch Oral Biol*, 38, 601-606.
- Collin-Osdoby P, Li L, Rothe L, et al. (1998). Inhibition of avian osteoclast bone resorption by monoclonal antibody 121F: A mechanism involving the osteoclast free radical system. *J Bone Miner Res*, 13, 67-78.
- Comeli CN, Lane JM (1992). New. st Factors in fraeture healing. *Orthop*, 277, 297-311.
- Durak K, Bilgen ÖF, Kaleli T, et al. (1996). Antioxidant effect of alfa-tocopherol on fracture haematoma in rabbit. *J Int Med Res*, 24, 419-424.
- Ellman G (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 2, 70-77.
- Engle WA, Yoder MC, Baurley JL, Yu P (1998). Vitamin E decreases superoxide anion production by polymorphonuclear leucocytes. *Pediatric Res*, 23, 245-248.
- Eyres KS, Saleh M, Kanis JA (1996). Effect of pulsed electromagnetic fields on bone formation and bone loss during limb lengthening. *Bone*, 18(6), 505-509.
- Frankel S, Reitman S, Sonnen AC (1970). A textbook on laboratory procedure and their interpretation. Ch 20. In: Grand-Wohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. The CV Mosby Comp, 1(7), 403-404.
- Frantz AL, Regner GG, Pflüger P, et al. (2017). Manual acupuncture improves parameters associated with oxidative stress and inflammation in PTZ-induced kindling in mice. *Neurosci Lett*, 661, 33-40.
- Frost HM (1989). The biology of fraeture healing. An overview for c1inieians. Part II. *Elin Orthop*, 248, 294-308.
- Gao C, Zhao J, Yang, D (2017). Efficacy of acupuncture in pain management of chronic diseases of bone and joint: a review of literature. *Int J Clin Exp Med*, 10(6), 8788-8800.
- Garrett IR, Boyce BF, Oreffo ROC, et al. (1990). Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, 85, 632-639.
- Göktürk E, Turgut A, Bayçu C, et al. (1995). Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*, 66, 473-475.
- Göktürk E (1997). Sıçanlarda serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesine etkisi. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 3, 353-356.
- Greenwald RA, Moy WW (1979). Inhibition of collagen gelation by action of the superoxide radical. *Arthritis Rheum*, 22 (3), 251-259.
- Halıcı M, Öner M, Güney A, et al. (2010). Melatonin promotes fracture healing in the rat model. *Eklem Hastalık Cerrahisi*, 21, 172-177.
- Harmankaya A, Özcan A (2017). Effect of different doses of mistletoe lectin-I on the levels of tumor necrosis factor- α , nitric oxide, total antioxidant and oxidant capacity in rabbits. *Van Vet J*, 28(1), 41-45.
- Histing T, Marciniak K, Scheuer C, et al. (2011). Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res*, 29, 867-873.
- Hunter J (2011). Acupuncture for keloid scar. *Acupunct Med*, 29(1), 2.

- Huo MH, Troiano NW (1991).** The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res*, 9(3), 383-390.
- Keskin D, Karsan O, Ezirmik N, Çiftçiöğlü A (1999).** Tavşanlarda kırık iyileşmesi üzerine alfa-tokoferolün etkisi. *Artroplastı-Artroskopik Cerrahi*, 10(2), 207-210.
- Kim HY, Sohn BY, Seo UK, et al. (2009).** An exploratory study of gold wire implantation at acupoints to accelerate ulnar fracture healing in rats. *J Physiol Sci*, 59(4), 329-333.
- Leveille SG, LaCroix AZ, Koepsell TD, et al. (1997).** Do dietary antioxidants prevent postmenopausal bone loss? *Nutr Res*, 17(8), 1261-1269.
- Li CF, Wang JR, Zeng Y, Sun P, Zhao L (2008).** Clinical observation on acupuncture combined with induction coupling for treatment of delayed union and nonunion. *Zhongguo Zhen Jiu*, 28(5), 334-336.
- Mammi GI, Rocchi R, Cadossi R, Massari L, Traina GC (1993).** The electrical stimulation of tibial osteotomies. Double-blind study. *Clin Orthop Relat Res*, 288, 246-253.
- McCord JM (1985).** Oxygen-derived free radicals and tissue injury. *N Engl J Med*, 312(3), 159.
- McKibbin M (1978).** The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg*, 60, 150-162.
- Nakajima M, Inoue M, Hojo T, et al. (2010).** Effect of electroacupuncture on the healing process of tibia fracture in a rat model: a randomised controlled trial. *Acupunct Med*, 28(3), 140-143.
- Norazlina M, Ima-Nirwana S, Gapor MTA, Khalid BAK (2002).** Tocotrienols are needed for normal bone calcification in growing female rats. *Asia Pacific J Clin Nutr*, 11(3), 194-199.
- Paley CA, Bennett MI, Johnson MI (2011).** Acupuncture for cancer-induced bone pain?. *Evid Based Complement Alternat Med*. 671043.
- Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC (1966).** Estimation of products of lipid peroxidation in biochemical systems. *Anal Biochem*, 16, 359-364.
- Schulman RA (2001).** Tibial shin splint treated with a single acupuncture session: case report and review of the literature. *Med Acup*, 13(1), 7-9.
- Serin E, Yılmaz E, Yılmaz S, Ünsaldı E, Durmuş AS (1998).** İskemi-reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikalleri (ratlarda deneysel çalışma). *Artroplastı Artroskopik Cerrahi*, 9(1), 36-39.
- Seyama A (1993).** The role of oxygen-derived free radicals and the effect of free radical scavengers on skeletal ischemia/reperfusion injury. *Jpn J Surg*, 23, 1060.
- Shandall AA, Williams OT, Hallett MB, Young HL (1986).** Colonic healing: a role for polymorphonuclear leucocytes and oxygen radical production. *Br J Surg*, 73(3), 225-228.
- Spiro AS, Khadem S, Jeschke A, et al. (2013).** The SERM raloxifene improves diaphyseal fracture healing in mice. *J Bone Miner Metab*, 31, 629-36.
- Suda N (1991).** Role of free radicals in bone resorption. *Kokubyo Gakkai Zasshi*, 58, 603-612.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988).** A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 34, 497-500.
- Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F, Toledo AH (2004).** Reactive oxygen species and molecular biology of ischemia/ reperfusion. *Ann Transplant*, 9, 81-83.
- Turgut A, Göktürk E, Köse N, et al. (1999).** Oxidant status increased during fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*, 70, 487-490.
- Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, et al. (2005).** Microcirculatory effects of melatonin in rat skeletal muscle after prolonged ischemia. *J Pineal Res*, 39, 57-65.
- Yeler H, Tahtabas F, Candan F (2005).** Investigation of oxidative stress during fracture healing in the rats. *Cell Biochem Funct*, 23, 137-139.
- Yılmaz S, Atessahin A, Sahna E, Karahan I, Ozer S (2006).** Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology*, 218 (2-3), 164-171.
- Yılmaz S, Yılmaz E (2006).** Effects of melatonin and vitamin E on oxidative-antioxidative status in rats exposed to irradiation. *Toxicology*, 222 (1-2), 1-7.
- Yılmaz S, Issi M, Kandemir MF, Gul Y (2014).** Malondialdehyde and total antioxidant levels and hematological parameters of beef cattle with coccidiosis. *YYU Vet Fak Derg*, 25, 41-45.