



# Melatonin ve kafeik asit fenetil ester'in iskemik şartlarda kırık iyileşmesi üzerine etkisi: Deneysel çalışma

Mehmet ERDEM<sup>1</sup>, Deniz GÜLABİ<sup>2</sup>, Murat AŞÇI<sup>3</sup>, Bora BOSTAN<sup>3</sup>,  
Taner GÜNEŞ<sup>3</sup>, Reşit Doğan KÖSEOĞLU<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Sakarya;

<sup>2</sup>Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, İstanbul;

<sup>3</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Tokat;

<sup>4</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Tokat

**Amaç:** Çalışmada melatonin ve kafeik asit fenetil ester (CAPE) antioksidan moleküllerinin iskemik ortamda kırık iyileşmesi üzerine etkisinin incelenmesi amaçlandı.

**Çalışma planı:** Kırık dört erkek Wistar-albino sıçan tibiasında kırık oluşturulup intramedüller pinleme ile tespit uygulandı. Daha sonra sıçanlar rastgele kırık, kırık-iskemi, kırık-iskemi-melatonin ve kırık-iskemi-CAPE gruplarına ayrıldı. İskemi gruplarındaki sıçanların femoral arterleri 4.5 saat süreyle kleplendi. Cerrahi girişimden 6 hafta sonra sıçanlar kurban edildi ve radyografik, histolojik ve biyomekanik değerlendirmeler yapıldı.

**Bulgular:** Radyografik ve histolojik olarak, 6. hafta sonunda kırık-iskemi-CAPE grubu kırık-iskemi grubundan anlamlı olarak iyi sonuçlar verdi. Tüm gruplarda, tüm kırıkların radyolojik ve histolojik olarak tam iyileştiği saptandı. Maksimum kırılma kuvvetlerinin (N) karşılaştırılmasında, gruplar arasında (kırık-iskemi < kırık-iskemi-melatonin < kırık < kırık-iskemi-CAPE) anlamlı fark bulundu ( $p < 0.005$ ). Sertlik dereceleri (N/mm) açısından kırık ve kırık-iskemi-CAPE grupları arasında anlamlı fark bulunmazken, diğer tüm gruplar arasındaki fark anlamlıydı. Kırık, kırık-iskemi-melatonin ve kırık-iskemi-CAPE gruplarındaki sertlik dereceleri, kırık-iskemi grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulundu ( $p < 0.001$ ).

**Çıkarımlar:** Vasküler yaralanma veya kompartman sendromu ile komplike hale gelmiş tibia kırıklarında, iskeminin kırık iyileşmesi üzerine olan muhtemel olumsuz etkileri, melatonin ve CAPE ile ortadan kaldırılabilmektedir.

**Anahtar sözcükler:** İskemi; kırık; kafeik asit fenetil ester; serbest oksijen radikalleri.

Damar yaralanmalı kırıklar, kompartman sendromu ve turnike süresinin uzadığı cerrahi girişimler ekstremiteleri iskemiyeye maruz bırakabilir. İskemik dokuların oksijenize kanla reperfüzyonu; hidroksil (OH), süperoksit an-

yon ( $O_2^-$ ), singlet oksijen ( $O_2$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve nitrik oksit (NO) gibi serbest oksijen radikallerinin (SOR) aşırı üretimine ve bunların kan dolaşımına katılmasına neden olur. SOR'lar, iskemik ekstremitelerde hücre

**Yazışma adresi:** Dr. Deniz Gülabi, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, 34890 Cevizli, Kartal, İstanbul.

Tel: +90 216 – 441 3900 / 419 e-posta: dgulabi@yahoo.com

**Başvuru tarihi:** 06.04.2012 **Kabul tarihi:** 07.01.2014

©2014 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği

Bu yazının çevrimiçi İngilizce versiyonu  
www.aott.org.tr adresinde  
doi: 10.3944/AOTT.2014.3244  
Karekod (Quick Response Code)



hasarına yol açarlar.<sup>[1,2]</sup> Kırık iyileşmesi sırasında da SOR oluşmakta ve enflamasyon fazını da içeren 15. günde maksimum düzeye ulaşmaktadır.<sup>[3,4]</sup> SOR düzeyindeki bu artış, kırık iyileşmesini olumsuz etkilemektedir.<sup>[5]</sup> Antioksidan savunma sistemi antioksidan enzimler ve melatonin ile serbest oksijen radikallerini temizlemeye çalışır.<sup>[6-8]</sup> Pineal bezden salgılanan ana ürün olan melatoninin sirkadiyen ve mevsimsel ritim, retinal fizyoloji, immün sistem ve üreme fonksiyonları üzerine etkisi vardır.<sup>[7,9]</sup> Ayrıca, melatoninin farklı iskemi/reperfüzyon modellerinde SOR'un etkisizleştirici etkisi gösterilmiştir.<sup>[7,9-11]</sup> CAPE, bal arısının oluşturduğu propolis maddesinden elde edilen ve SOR'un etkisizleştirici özelliğe sahip diğer önemli bir antioksidan moleküldür.<sup>[8,12]</sup>

Çalışmamızda melatonin ve kafeik asit fenetil ester (CAPE) antioksidan moleküllerinin iskemik ortamda kırık iyileşmesi üzerine etkisinin incelenmesi amaçlandı.

## Gereç ve yöntem

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanan çalışma, üniversitenin deney hayvanları araştırma laboratuvarında yürütüldü. Kırık dört adet sıçan rastgele seçilerek, her bir grupta 11 tane olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Ortalama 377 gr (334-422 gr) ağırlığında yetişkin erkek Wistar-albino sıçanlar kullanıldı. Gruplar sadece kırık, iskemi-kırık, iskemi-kırık-melatonin ve iskemi-kırık-CAPE olarak adlandırıldı. Antibiyotik profilaksisi ameliyattan 30 dakika önce intramusküler 20 mg/kg sefazolin sodyum ile uygulandı ve postoperatif 8. saatte ek bir doz daha uygulanıp antibiyotik profilaksisi sonlandırıldı. Genel anestezi, intramusküler ketamine (90 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) ile uygulandı. Wistar-albino sıçanların sağ alt ekstremiteleri aseptik koşullarda boyandıktan sonra femoral sinir, ven ve arter inguinal ligament distalinden disseksiyon ile serbestleştirildi. Mikrovasküler klemp, femoral arter akımını önlemek için hazır bulundu. Medial parapatellar yaklaşık 1 cm'lik insizyon ile girilip patella laterale disloke edildi. Tüberositas tibia'nın hemen üzerinden 21 numara iğne ile tibia medüller kanalına girilip kanal oyuldu. 0.8 mm paslanmaz çelik tel (TST, Kurtköy, İstanbul, Türkiye) tibia medüller kanal içine sokuldu. Tel proksimal kısmı bükülerek kesildi ve patella redükte edilip, insizyon kapatıldı. Daha sonra An ve ark. tanımladıkları şekilde kapalı, transvers mid-diafizyal tibial kırık oluşturuldu (Şekil 1).<sup>[13]</sup>

Kırık oluşturulduktan hemen sonra Skjeldal ve ark.'nın tanımladıkları gibi femoral arter ligasyonu ile iskemi oluşturuldu.<sup>[14]</sup> 4.5 saat sonrasında, klips açılıp iskemi sonlandırıldı, femoral arteriyel akım gözlemlendi ve kasık insizyonu kapatıldı. İskemi süresince ve sonrasında



**Şekil 1.** Sıçan tibiasında kapalı, mid-diafizyal kırık oluşturma tekniğini gösteren görünüm. [Bu şekil, derginin [www.aott.org.tr](http://www.aott.org.tr) adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

da hayvanlar 24°C oda ısısında, ısıtma battaniyesi içinde supin pozisyonunda muhafaza edildi. İskemi oluşturulan hayvanlara, dehidratasyonu önlemek için iskemi süresince 4 ml %0.9 NaCl izotonik solüsyon intraperitoneal olarak verildi. Postoperatif ağrıyı kontrol etmek için intramusküler narkotikler verildi. İskemi-melatonin grubuna, iskemi başlatılması ile eş zamanlı olmak üzere, günde tek doz 14 gün boyunca melatonin (25 mg/kg, her 1 ml'de %10 etanol) (Sigma, St. Louis, MO, USA); iskemi-CAPE grubuna, iskemi başlatılması ile eş zamanlı olmak üzere (MO, USA) (10 µmol/kg her 1 ml'de %10 etanol) verildi. Bu miktarlar belirlenirken Histing ve ark.'nın çalışması referans olarak değerlendirmeye alındı.<sup>[15]</sup> Deney, 6. hafta sonunda hayvanlar öldürücü doz intravenöz sodyum pentobarbital ile sakrifiye edilerek sonlandırıldı. Tibia kemikleri yumuşak dokularından temizlendi ve biyomekanik çalışmanın yapılacağı zamana kadar -20°C'de saklandı. Tüm gruplardaki sıçanların osteotomi sonrası 0. ve 6. hafta sonunda grafileri çekildi ve osteotomi bölgesindeki kemik oluşumu, Lane ve Sandhu radyolojik değerlendirme sistemine göre yapıldı (Tablo 1).<sup>[16]</sup> Biyomekanik değerlendirme "üç noktadan bükme" makinesi ile (Hounsfield H50KM Surrey, İn-

**Tablo 1.** Kırık bölgesindeki yeni kemik oluşumunun radyografik değerlendirilmesi.

	Radyolojik değerlendirme sistemi	Puan
Kemik oluşumu	Kemik oluşum kaybı	0
	Defektin %25'inin kemik oluşum doldurması	1
	Defektin %50'sinin kemik oluşum doldurması	2
	Defektin %75'inin kemik oluşum doldurması	3
	Defektin %100'nün kemik oluşum doldurması	4
Kaynama	Kaynamama	0
	Kaynama başlangıcı	1
	Komplet radyolojik kaynama	2
Remodeling	Remodeling oluşmamış	0
	İntramedüller kanal oluşumu	1
	Korteks oluşumu	2
	Maksimal toplam puan	10
	Kemik oluşumu	4
	Proksimal kaynama	2
	Distal kaynama	2
Remodeling	2	

giltire) yapıldı. Tibia numuneleri, intramedüller teller çıkartıldıktan sonra kuvvet uygulayıcının ucuna doğru makinenin üzerine konuldu. 10 mm/dakika sabit hızla kırık iyileşme bölgesine, tekrar kırık oluşturacak şekilde kuvvet uygulandı. Tekrar kırık oluşturan kuvvet newton birim olarak kaydedildi. Sakrifiye edilen hayvanların tibialarından histopatolojik inceleme için numuneler %10 nötral tamponlu formalinde 48 saat fikse edildikten sonra, dekalsifikasyon için 0.1-M citrate içinde %10 formik asitte 12 saat bekletildi. Dekalsifikasyon işleminden sonra tibiadan uzunlamasına kesitler alındı. Bu kesitlerden kırık hattı kallus bölgesinden histopatolojik inceleme için 5 mikrometre kalınlıkta parafin kesitleri hazırlandı ve histolojik inceleme için Hematoksin-Eozin ile boyandı. Değerlendirme için ışık mikroskobu kullanıldı. Histolojik değerlendirme, Huddlestone ve ark. histolojik değerlendirme sistemine göre yapıldı.<sup>[17]</sup>

Çalışmada kullanılan sürekli değişkenler Kolmogorov Smirnov testine göre normal dağılım gösterdiğinden dolayı 4 grup arasındaki karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalarda ise varyans homojenliği durumuna göre Sheffe ve Tamhane testleri kullanıldı. Sürekli değişkenler aritmetik ortalama ve standart sapma ile ifade edildi. İstatistiksel değerlendirmede 0.05'in altındaki p değerleri anlamlı kabul edildi Değerlendirmede PASW v18 (SPSS Inc, Chicago, IL, ABD) yazılımı kullanıldı.

### Bulgular

Çalışma, her gruptan birer sıçanın enfeksiyon ya da diare sonucu ölmesiyle, toplam 40 sıçan ile tamamlandı. Altıncı hafta sonunda çalışmayla ilgili bilgisi olmayan 2



**Sekil 2.** Altıncı hafta sonunda dört grubun radyolojik görüntüleri (a) iskemik-kırık (b) sadece kırık (c) iskemik-melatonin (d) iskemik-CAPE.

**Tablo 2.** Gruplara göre radyoloji skoru ve 6. hafta histolojik skor değerlendirmesi.

Gruplar	Radyoloji Skoru Ort±SD	6. Hafta Histolojik Skor Ort±SD
Kırık	9.10±0.74	8.90±0.74
İskemi-kırık	8.60±0.52	7.50±0.97
Kırık+iskemi+melatonin	9.00±0.67	8.60±0.69
Kırık+iskemi+CAPE	9.40±0.52	9.30±0.48
P	0.048*	0.001**
ANOVA test	*p<0.05	**p<0.01

**Tablo 3.** Grupların biyomekanik test sonuçları.

Grup	Kırık no	Kırılma kuvveti (N)	Sertlik (N/mm)
Kırık	10	52.6±16.6	91.7±33.9
İskemi-kırık	10	19.1±9.3	35.5±13.2
Melatonin-iskemi-kırık	10	37.2±14.5	67.4±20.0
CAPE-iskemi-kırık	10	71.1±20.0	106.6±16.4
P		<0.001*	<0.001**

gözlemci tarafından deneklerin radyolojik parametreleri değerlendirildi ve tespit edilen matematiksel değerlerin ortalamaları alındı. 6. hafta sonunda, çekilen grafilerde, her dört gruptaki tüm kemikler, Lane ve Sandhu radyolojik değerlendirme sistemine göre değerlendirildi (Şekil 2a-d).<sup>[16]</sup> Tüm gruplarda radyolojik olarak kaynama saptandı. Altıncı haftada yapılan ortalama radyolojik skorların istatistiksel değerlendirmesinde gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulundu ( $p<0.05$ ). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan Scheffe testinde CAPE-iskemi grubunun skor ortalaması iskemi-kırık grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 1). Altıncı haftadaki histolojik skorlar açısından, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p<0.05$ ). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için Scheffe testi yapıldı. Kırık grubunun, melatonin-iskemi grubunun ve CAPE-iskemi grubunun skor ortalamaları iskemi-kırık grubundan istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p=0.002$ ,  $p=0.021$ ,  $p=0.001$ ) (Tablo 2). Histolojik değerlendirme, Huddlestone ve ark. tarafından tanımlanan histolojik değerlendirme sistemine göre yapıldı.<sup>[17]</sup> Kırık grubunun, melatonin-iskemi grubunun ve CAPE-iskemi grubunun histopatolojik incelemesinde kırık hattında osteoblastlardan zengin, neovaskülarizasyonun sık olduğu matür kompakt kemik adacıklarından zengin görüntü saptandı.

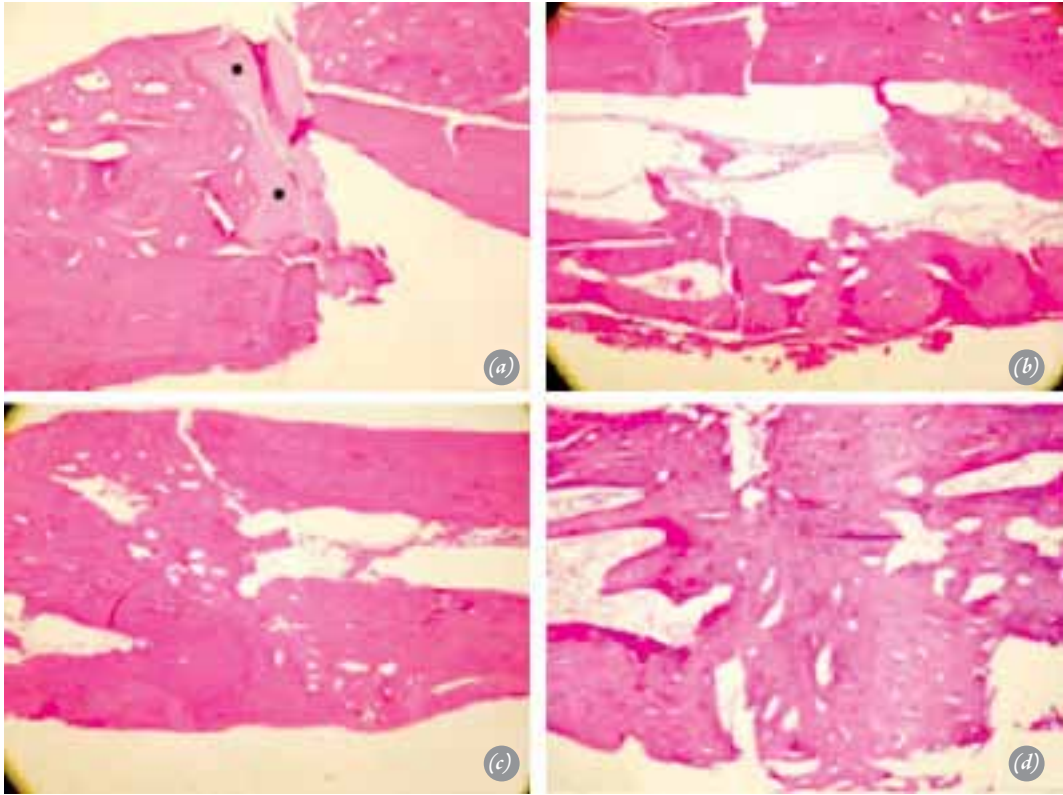
Kırık-iskemi grubunda ise kırık sahasının ağırlıklı olarak hyalin kırık dokusundan zengin iyileşme do-

kuşu, hyalin kırıkdağa komşu alanlarda matür kompakt kemik doku sahaları yer almaktaydı. Özellikle kırık grubu ve CAPE-iskemi grubunda osteoblastik aktivitenin daha yoğun olduğu gözlemlendi. Kırık-iskemi grubunda ise osteoblastik aktivitenin daha zayıf olduğu kompakt kemik iyileşmesi izlendi (Şekil 3a-d).

Maksimum kırılma kuvvetleri karşılaştırıldığında, en düşük değer, iskemi-kırık grubunda gözlemlenirken, en yüksek değer iskemi-CAPE grubunda gözlemlenmiştir. Kırılma kuvveti düşükten yükseğe doğru; iskemi-kırık<iskemi-melatonin<kırık<iskemi-CAPE olarak tespit edilmiş olup, aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). Sadece kırık, iskemi-melatonin ve iskemi-CAPE gruplarının sertlik dereceleri, iskemi-kırık grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulundu ( $p<0.001$ ). En düşük sertlik derecesi iskemi-kırık grubunda tespit edildi (Tablo 3).

## Tartışma

Vasküler yaralanmalar ve kompartman sendromunun eşlik ettiği kırıklarda, ekstremiteler belirli bir süre iske miye maruz kalmakta ve iskemi süresi sonlandıktan sonra reperfüzyon gerçekleşmektedir. İskemik durumlarda temel amaç, erken reperfüzyonu sağlayarak kas nekrozunu önlemektir. Bununla birlikte reperfüzyonun kendisi "reperfüzyon yaralanması" olarak adlandırılan patofizyolojik bir duruma yol açmaktadır.<sup>[18]</sup> İskemi sonrası doku hasarı, çoğunlukla reperfüzyon sırasında oluşur.<sup>[19]</sup> Reperfüzyon, iskemik dokularda nötrofillerin birikimine ve endotel hücrelerinde ksantin oksidaz aktivitesinin art-



**Şekil 3.** Altıncı hafta sonunda histopatolojik inceleme **(a)** İskemi-kırık grubunda; kırık hattının ağırlıklı olarak hyalin kırıkdağ dokusu ile iyileşme aşamasındaki görünümü, hyalin kırıkdağa komşu alanlarda matür kompakt kemik doku sahaları mevcut (H-E  $\times$  80), osteoblastlar nadir gözlenmektedir **(b)** Sadece kırık grubu: osteoblastların çok sayıda olduğu matür kemik dokusu (H-E  $\times$  80) **(c)** İskemi-melatonin grubunda; osteoblastların sayıca az olduğu matür kemik iyileşme görüntüsü (H-E  $\times$  80) **(d)** İskemi-CAPE grubunda, osteoblastlardan zengin matür lamellar ve kompakt kemik iyileşme dokusu (H-E  $\times$  80). [Bu şekil, derginin [www.aott.org.tr](http://www.aott.org.tr) adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

masına neden olur ki, bu olaylar, süperoksit anyon ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikal (OH) olarak bilinen SOR'ların hızlı bir şekilde üretimine yol açar. Bu serbest radikaller, iskemik/reperfüzyon modellerinde gösterildiği gibi iskelet kası, endotel ve diğer hücrelerde toksik etkiye sahiptir.<sup>[11,18-20]</sup>

Kırık iyileşmesini hızlandırmak için birçok yazar farklı kimyasal ajanları kullanarak *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda çalışmalar yapmıştır. Histing ve ark. sıçanlar üzerinde yapmış oldukları deneysel çalışmada sidenafilin, siklik guanozin monofosfat fosfodiesteraz 5'i inhibe ederek, kırık iyileşmesini hızlandırdığını göstermişlerdir.<sup>[21]</sup> Spiro ve ark. yapmış oldukları deneysel sıçan çalışmasında selektif östrojen modulatorü olan raloksifenin kırık iyileşmesinin erken fazlarında katkısı olduğunu göstermişlerdir.<sup>[22]</sup> Bukato teriparatidin kırık kallus oluşumunu ve kırık iyileşmesini hızlandırdığını bildirmiştir.<sup>[23]</sup> Yine elektromanyetik alanların da, kemik direnci ve kırık iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştıran makalelerde radyasyonun olumsuz yönü vurgulanmaktadır.<sup>[24]</sup>

Deneysel çalışmalarda, kırık iyileşmesinin enflamasyon evresinde SOR'un arttığı gösterilmiştir.<sup>[3,4]</sup> SOR'un artması, kırık iyileşmesini olumsuz olarak etkilemektedir.<sup>[5]</sup> Osteoklast hücreleri, kemik rezorpsiyonu süresince, önemli bir SOR olan süperoksit anyonu üretirler ve süperoksit anyonun, kemik yıkımına önemli bir katkısı olduğu gösterilmiştir.<sup>[25]</sup> Geçici iskemik ve reperfüzyonun eşlik ettiği tibia kırıklarında oluşan SOR miktarının, kırık iyileşmesinin enflamasyon evresinde oldukça yüksek olduğu saptanmıştır.<sup>[26]</sup> Çalışmamızda, iskeminin eşlik ettiği kırık grubunun kırılma kuvveti, kontrol (sadece kırık) grubundan anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu nedenle, uzun süreli iskemik, kırık iyileşmesini olumsuz etkileyebilir. Bununla birlikte Çetin ve ark. belirttiği gibi yüksek seviyede SOR etkisinden kaynaklandığını düşünüyoruz.

Melatonin pineal bez tarafından salgılanır. Vücut ısısını, sirkadiyen ve mevsimsel ritmi düzenler, SOR'u temizleyici özelliği vardır. Ayrıca hücre kültürlerinde, osteoblast diferansiyasyonunu ve matriks mineralizasyonunu artırır.

yonunu uyarıcı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.<sup>[27,28]</sup> Ayrıca antioksidan özelliğiyle kırık dokuda oluşan SOR'u etkisiz hale getirerek kırık iyileşmesini arttırdığı bildirilmiştir.<sup>[29]</sup> Melatonin'in iskemi sonrası reperfüzyonun vücutta oluşturduğu bir çok doku hasarını azalttığı gösterilmiştir.<sup>[6,7,9]</sup> Bizim çalışmamızda 4.5 saat geçici iskemi ile birlikte tibia kırığı oluşturulan melatonin-kırık grubunda, biyomekanik kırılma kuvveti, kontrol kırık grubundan düşük bulunmakla birlikte, iskemi-kırık grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu. Melatonin'in iskemiyile birlikte olan tibia kırıklarında olumlu etkisi olduğunu düşünüyoruz. Melatonin iskemide oluşan SOR'un inhibisyonunda önemli bir katkısı olduğu muhtemeldir. Melatonin-iskemi grubunun histopatolojik, radyolojik ve biyomekanik sonuçları kontrol grubundan düşük olmakla birlikte fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Böylece, melatoninin, ortopedik pratikte, iskeminin yarattığı negatif etkiyi ortadan kaldıran bir ajan olarak kullanılmasının faydalı olabileceğini düşünüyoruz. Çeşitli deneysel çalışmalarla melatoninin iskemi üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir.<sup>[6,10,11]</sup> CAPE, bal arılarının ürettiği propolisin etken moleküllerinden biridir. CAPE güçlü bir immunomodülatör, antikarsinogenik, antiinflamatuvar ve antioksidandır.<sup>[30]</sup> Bu özelliklerinden dolayı son yıllarda medikal tedavide kullanılmaya başlanmıştır. CAPE, güçlü bir SOR etkisizleştirici antioksidan molekül olup, bu etkisi iskemi-reperfüzyon modellerinde gösterilmiştir.<sup>[12,31,32]</sup> Çiçek ve ark. deneysel çalışmasında, CAPE'nin sıçan femurlarında kırılma kuvvetini ve eğilme kuvvetini arttırdığını, Ang ve ark. deneysel çalışmasında ise CAPE'nin RANKL'e bağlı NF-Kb'i inhibe ederek osteoklast differansiasyonunu ve aktivasyonunu inhibe ettiklerini göstermişlerdir.<sup>[24,33]</sup> Çalışmamızda, iskemi-CAPE grubundaki kırılma kuvvetinin, radyolojik ve histopatolojik değerlerin diğer üç gruptan daha yüksek olduğu tespit edildi. Melatonin verilen gruptaki kırılma kuvveti kontrol kırık grubunu geçmezken, CAPE grubu, kontrol grubunu geçmekle birlikte, istatistiksel olarak anlamlı değildi. Böylece CAPE, iskemi ile komplike hale gelmiş tibia kırık modelinde, melatonin'in de üzerinde, kırık iyileşmesine pozitif katkısını gözlemledik. CAPE'nin bu etkisi, SOR'u etkisizleştirici etkisi üzerinden olmakla birlikte, ayrıca RANKL'e bağlı NF-Kb'i inhibe ederek osteoklastların aktivasyonunu engellemesinden de kaynaklandığını düşünüyoruz.

Ayrıca CAPE-iskemi grubunda melatonin-iskemi grubundan daha iyi sonuçlar elde edildi. Histing ve ark. melatoninin RANKL'e bağlı osteoklastları suprese ederek kırık iyileşmesini geciktirdiğini bildirmişlerdir.<sup>[15]</sup> Biz de bu bulguyu destekleyen sonuçlar elde ettik. Ayrıca farklı etki mekanizmalarının olup olmadığı, im-

münohistokimyasal ve protein biokimyasal analizleride içeren deneysel araştırmalarla ile aydınlanabilir. Melatonin tedavisi sonrası görülen kartilaj dokuda artış ile kallus dokusunun belirgin şekilde artması ve gecikmiş kemik remodelasyonu, negatif sonuç olarak ortaya çıktı ve melatoninin olumsuz özelliğini oluşturdu. Histing ve ark. yapmış oldukları deneysel çalışmada, melatonin ile tedavi edilen sıçanlarda kallus dokusunun kontrol grubuna göre belirgin şekilde arttığını gözlemlemişlerdir.<sup>[15]</sup> Bunun da kemik remodelasyonunu geciktirdiğini bildirmişlerdir. SOR düzeylerinin pre ve post-op dönemde ölçülmemiş olması çalışmamızın zayıf tarafıdır.

İskemi ve sonrasında reperfüzyon ile komplike tibia kırığında, iskeminin kırık iyileşmesini olumsuz etkilediğini gördük. Melatonin ve CAPE, iskeminin bu olumsuz etkisini ortadan kaldırmaktadır. Ortopedik pratikte, vasküler yaralanma veya kompartman sendromu ile komplike hale gelmiş tibia kırıklarında, iskeminin kırık iyileşmesi üzerine olan muhtemel olumsuz etkileri, melatonin ve CAPE ile ortadan kaldırılabilir.

*Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2006/29).*

**Çıkar örtüşmesi:** Çıkar örtüşmesi bulunmadığı belirtilmiştir.

## Kaynaklar

1. Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspects Med* 1993;14:191-7.
2. Clanton TL, Zuo L, Klawitter P. Oxidants and skeletal muscle function: physiologic and pathophysiologic implications. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;222:253-62.
3. Turgut A, Göktürk E, Köse N, Kaçmaz M, Öztürk HS, Seber S, et al. Oxidant status increased during fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 1999;70:487-90.
4. Yeler H, Tahtabas F, Candan F. Investigation of oxidative stress during fracture healing in the rats. *Cell Biochem Funct* 2005;23:137-9.
5. Göktürk E, Turgut A, Bayçu C, Günel I, Seber S, Gülbas Z. Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 1995;66:473-5.
6. Erdem M, Bostan B, Güneş T, Özkan F, Sen C, Özyurt H, et al. Protective effects of melatonin on ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle. *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi* 2010;21:166-71.
7. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004;36:1-9.
8. Özyurt H, Irmak MK, Akyol O, Söğüt S. Caffeic acid phenethyl ester changes the indices of oxidative stress in serum of rats with renal ischaemia-reperfusion injury. *Cell Biochem Funct* 2001;19:259-63.

9. Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* 2003;34:1-10.
10. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Enzan H, Miyahara Y. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol* 2003;469:145-52.
11. Sener G, Sehirlı AO, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yeğen BC. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *J Pineal Res* 2002;32:120-6.
12. Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett* 1993;329:21-4.
13. An Y, Friedman RJ, Parent T, Draughn RA. Production of a standard closed fracture in the rat tibia. *J Orthop Trauma* 1994;8:111-5.
14. Skjeldal S, Grøgaard B, Reikerås O, Müller C, Torvik A, Svindland A. Model for skeletal muscle ischemia in rat hindlimb: evaluation of reperfusion and necrosis. *Eur Surg Res* 1991;23:355-65.
15. Histing T, Anton C, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, et al. Melatonin impairs fracture healing by suppressing RANKL-mediated bone remodeling. *J Surg Res* 2012;173:83-90.
16. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am* 1987;18:213-25.
17. Huddleston PM, Steckelberg JM, Hanssen AD, Rouse MS, Bolander ME, Patel R. Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 2000;82:161-73.
18. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Baynosa RC, Khiabani KT, Zamboni WA. Microcirculatory effects of melatonin in rat skeletal muscle after prolonged ischemia. *J Pineal Res* 2005;39:57-65.
19. Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F, Toledo AH. Reactive oxygen species and molecular biology of ischemia/reperfusion. *Ann Transplant* 2004;9:81-3.
20. Ozyurt H, Ozyurt B, Koca K, Ozgocmen S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress. *Vascul Pharmacol* 2007;47:108-12.
21. Histing T, Marciniak K, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, et al. Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res* 2011;29:867-73.
22. Spiro AS, Khadem S, Jeschke A, Marshall RP, Pogoda P, Ignatius A, et al. The SERM raloxifene improves diaphyseal fracture healing in mice. *J Bone Miner Metab* 2013;31:629-36.
23. Bukata SV. Systemic administration of pharmacological agents and bone repair: what can we expect. *Injury* 2011;42:605-8.
24. Cicek E, Gokalp O, Varol R, Cesur G. Influence of electromagnetic fields on bone fracture in rats: role of CAPE. *Biomed Environ Sci* 2009;22:157-60.
25. Collin-Osdoby P, Li L, Rothe L, Anderson F, Kirsch D, Oursler MJ, Osdoby P. Inhibition of avian osteoclast bone resorption by monoclonal antibody 121F: a mechanism involving the osteoclast free radical system. *J Bone Miner Res* 1998;13:67-78.
26. Cetinus E, Kiliç M, Uzel M, Inanç F, Kurutaş EB, Bilgic E, et al. Does long-term ischemia affect the oxidant status during fracture healing? *Arch Orthop Trauma Surg* 2005;125:376-80.
27. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 1999;274:22041-7.
28. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991;12:151-80.
29. Halıcı M, Öner M, Güney A, Canöz Ö, Narin F, Halıcı C. Melatonin promotes fracture healing in the rat model. *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi* 2010;21:172-7.
30. Elmali N, Ayan I, Türköz Y, Mizrak B, Germen B, Bora A. Effect of caffeic acid phenethyl ester on cartilage in experimental osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2002;22:222-6.
31. İlhan A, Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Ciralık H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;16:458-63.
32. Gurel A, Armutcu F, Sahin S, Sogut S, Ozyurt H, Gulec M, et al. Protective role of alpha-tocopherol and caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury via nitric oxide and myeloperoxidase in rat kidneys. *Clin Chim Acta* 2004;339:33-41.
33. Ang ES, Pavlos NJ, Chai LY, Qi M, Cheng TS, Steer JH, et al. Caffeic acid phenethyl ester, an active component of honeybee propolis attenuates osteoclastogenesis and bone resorption via the suppression of RANKL-induced NF-kappaB and NFAT activity. *J Cell Physiol* 2009;221:642-9.