

Çevresel Kurşunun Kortikal Kemiğin İntrinsik Biyomekanik Özellikleri Üzerine Etkisi

Effect of Environmental Lead on Intrinsic Biomechanical Properties of Cortical Bone

Oya ÖGENLER¹, Ükü ÇÖMELEKOĞLU², Selda BAĞIŞ³, Altan YILDIZ⁴, Lülüfer TAMER⁵

¹Mersin Üniversitesi Mediko Sosyal Birimi, Mersin

²Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Mersin

³Başkent Üniversitesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Adana

⁴Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyodiagnostik Anabilim Dalı, Mersin

⁵Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin

Özet

Amaç: Bu çalışmada çevresel kurşunun, kortikal kemiğin intrinsik biyomekanik özellikleri üzerine etkisinin incelenmesi hedeflendi.

Yöntem: 10 haftalık Sprague–Dawley dişi ve erkek sıçanlar kontrol ve deney grubu olmak üzere rastgele iki gruba ayrıldı (n=20, her grupta 10 erkek, 10 dişi). Deney grubundaki sıçanlara 10 hafta boyunca 100mg/kg dozunda kurşun asetat gavajla uygulandı. Kemik mineral yoğunluğu çift enerjili X ışınları absorpsiyometrisi ile kortikal femurun kesit alanı ise bilgisayarlı tomografiyle ölçüldü. Biyomekanik ölçümler sol femur diafizinde gerçekleştirildi. Tüm sıçanlarda stres, strain ve dayanıklılık ölçüldü.

Bulgular: Kortikal kemik biyomekanik parametreleri açısından kontrol grubuyla deney grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmedi.

Sonuç: Bu çalışma sonucunda düşük doz kurşunun kemiğin intrinsik biyomekanik kalitesini değiştirmedeği ve cinsiyet farklılığının da kemiğin intrinsik biyomekanik özelliklerinde herhangi bir etkisi olmadığı gözlemlendi.

Anahtar Sözcükler: kurşun asetat, kemik biyomekaniği, kortikal kemik, kollajen

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2008;1(1):10-14

Geliş Tarihi : 17.10.2007

Kabul Tarihi : 17.01.2008

Yazışma Adresi:

Dr. Oya ÖGENLER

Mersin Üniversitesi Mediko Sosyal Birimi

Çiftlikköy Kampüsü, 33343-Mersin

Tel : 0 324 361 00 01/4154

Faks : 0 324 341 24 00

E-posta : icel_oya@yahoo.com

Abstract

Objective: This study aimed to investigate the effects of low dose lead on the biomechanical properties of cortical bone.

Method: 10 week-old Sprague–Dawley male and female rats were assigned randomly to a control group and experimental group (n=20, 10 male and 10 female for each group). The experimental rats were treated by gavage (per os) with 100mg/kg lead acetate dissolved in saline once per week for 10 weeks. Bone mineral density (BMD) was measured at mid-diaphysis femoral region using by dual energy X-ray absorpsiyometry. Cross-sectional area of the femoral shaft was evaluated by computerized tomography. Biomechanical measurements were performed at the mid-diaphysis of the left femur. Stress, strain and toughness were measured in all rats.

Results: No significant differences were observed between control and experimental groups for biomechanical properties of cortical bone.

Conclusion: The results of the present study indicate that low dose lead acetate administration did not change bone quality. Gender differences also did not change the effect of lead on the intrinsic properties of rat cortical bone.

Key Words: lead acetate, bone biomechanics, cortical bone, bone mineral density

Bu araştırma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP, TIP FB (ÜÇ)2003-1 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Giriş ve Amaç

Kurşun yaşamda önemli yeri olan, bilinen en eski metallere biridir. Endüstride akümülatör, su, ses, radyasyon izolasyonunda, muşamba, boya ve alaşımlarda, elektronik iletkenlerde lastik, lehim, oyuncak ve mücevher yapımında kullanılır (1,2). Kurşunlu benzinde, tozda, toprakta, havada ve suda bol miktarda bulunur. Önemli kurşun kaynakları ülkelere göre değişiklik gösterir. Amerika Birleşik Devletleri'nde en önemli kurşun kaynağının eski boyalı evler, ülkemizde ise kurşunlu benzin kullanımından çıkan egzoz gazları olduğu bildirilmiştir (3).

Kurşunun absorpsiyonunu birçok faktör etkiler. Demir, kalsiyum, protein ve çinko eksikliği kan kurşun düzeyinde artışa neden olur (4). Kurşunun kandaki yarılanma ömrü 25 gün, yumuşak dokudaki 40 gün ve kemikteki 25 yıldan fazladır (5).

Yüksek doz kurşun hem çocuklarda hem de yetişkinlerde çeşitli patolojilere yol açar. Kan kurşun düzeyinin yetişkinlerde 80-100 µg/dL'ye, çocuklarda 100-120 µg/dL'ye ulaşması ensefalopati ve anemiye, 20 µg/dL işitme kaybına, 40 µg/dL nefropati ve sinir iletim hızında azalmaya neden olur (6).

Yetişkinlerde absorbe edilen kurşunun büyük kısmı kemikte depolanır. Kemikler vücut iskeletini oluştururlar. Kemik kütlelerinin korunması kemik hücreleri tarafından sağlanır. Kemik hücreleri kemik matriksinin oluşumundan, kemik mineralizasyonundan ve kemik rezorpsiyonundan sorumludur (7). Kemik hücrelerinin işlevleri sistemik ve lokal faktörlerle düzenlenir. Sistemik faktörler paratiroid hormon, kalsitonin ve 1.25 dihidroksikolekalsiferol (vitamin D3), lokal faktörler ise sitokinler ve büyüme faktörleridir (8). Kurşun, dolaşımında kemik hücre fonksiyonunu modüle eden 1.25 dihidroksikolekalsiferol düzeyini değiştirerek, kemik hücre fonksiyonunu dolaylı olarak etkiler. Osteokalsin sentezini inhibe eder (9). Ayrıca kalsiyumla yarışarak kemiğin mineral matriksine yerleşir. Bu nedenle kurşunun osteoporoz için önemli bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (10-12).

Kemikler mineral ve kollajen fazı olmak üzere iki faz içerirler. Kemiğin kırılmaya karşı gösterdiği direnç bu iki fazla ilişkilidir. Mineral faz deformasyon, sertlik ve kırılıncaya kadar depolanan enerji gibi kemiğin ekstrinsik özellikleri ile temsil edilirken, kollajen fazı stres, strain ve dayanıklılık gibi intrinsik biyomekanik özellikleri ile temsil edilir (13).

Yüksek doz kurşunun kortikal kemik üzerine etkisi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma olmasına rağmen (14) günlük yaşamda çevresel faktörlerden kaynaklanan düşük doz kurşunun kortikal kemiğin intrinsik biyomekanik kalitesini etkileyip etkilemediğine ilişkin herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

Bu çalışmada trafik, toz, toprak, su ve besinler aracılığıyla maruz kalınan kurşun miktarının kortikal kemiğin intrinsik biyomekanik özelliklerini etkileyip

etkilemediğini saptamak ve cinsiyet farklılığının bu etkideki rolünü belirlemek amaçlanmıştır.

Yöntem

Deneylerde ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen 20 adet erkek, 20 adet dişi olmak üzere 40 adet dört aylık Sprague-Dawley albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar deney süresince 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda, oda sıcaklığı 21°C ve ortalama nem yaklaşık %50 olacak şekilde galvaniz kafeslerde tutuldu, deney süresince standart sıçan yemi ile beslendi, su gereksinimleri *ad libitum* olarak karşılandı. Sıçanlar kontrol (10 dişi, 10 erkek) ve deney (10 dişi, 10 erkek) grubu olmak üzere rastgele iki gruba ayrıldı. Sıçanlara tüm işlemler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındıktan sonra uygulandı.

Deney grubundaki sıçanlara 100 mg/kg kurşun asetat (lead acetate 3 hydrate 01430 Rod Riedal Detlaen) gavaj yoluyla 10 hafta süresince verildi. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir uygulama yapılmadı.

Onuncu hafta sonunda kan kurşun düzeyini ölçmek için kalpten heparinli tüpe kan alındı. Kan alma işlemi tamamlandıktan sonra yüksek dozda ketamin uygulanarak deneklerin yaşamları sonlandırıldı. Sıçanların sağ ve sol femurları çıkarıldı. Sol femurlar biyomekanik analiz için, sağ femurlar ise kortikal kemik kesitinin görüntülenmesi ve kemik kurşun düzeyinin belirlenmesi için kullanıldı. Biyomekanik test için ayrılan kemikler mekanik test yapılıncaya kadar -20°C'de bekletildi.

Biyomekanik ölçümler kortikal femurda yapıldı. Dondurulmuş olarak saklanan femurlar oda sıcaklığına getirildikten sonra biyomekanik cihazına yatay olarak yerleştirildi ve uçları akrilik ile tespit edildi. Daha sonra femurlara BIOPAC MP 100 sistemiyle uyumlu biyomekanik cihazı (MAY 03, ABD) ile çekme testi uygulandı. Kuvvet verileri 16 bitlik analog/sayısal çevirici ile saniyede 1000 örnek alınarak bilgisayara aktarıldı ve daha sonra analiz etmek üzere bilgisayara kaydedildi. Modülün çekme hızı 2 mm/dakika, uyguladığı kuvvet 5 g/s olarak ayarlandı. Bilgisayardaki veriler BIOPAC MP 100 Acquisition System Version 3.5.7 (Santa Barbara, ABD) kullanılarak analiz edildi. Bu verilerden yük-deformasyon eğrileri elde edildi. Yük-deformasyon eğrileri normalize edilerek stres-strain eğrisine dönüştürüldü. Stres-strain eğrisinden maksimum stres, maksimum strain ve dayanıklılık hesaplandı. Maksimum stres kemik kırılmadan önceki stresi tanımlamaktadır ve $\sigma = F/A$ bağıntısı ile hesaplanır. Bu bağıntıda σ maksimum stresi, F kemiğin kırıldığı andaki kuvveti, A ise kortikal kemiğin kesit alanını tanımlamaktadır (15). Kesit alanını hesaplamak için

bilgisayarlı tomografi ile (ARSTAR 40, Erlangen, Almanya) femurların enine kesitleri elde edildi ve stereolojik nokta sayma yöntemi ile femurların kesit alanları hesaplandı. Maksimum strain $\epsilon = \Delta L / \Delta L_0$ bağıntısından hesaplandı. Burada (ϵ) maksimum straine, ΔL kemiğin boyunda meydana gelen değişikliğe (deformasyon), L_0 ise kemiğin başlangıçtaki boyuna karşılık gelmektedir (15). Dayanıklılık ise stres-strain eğrisinin altında kalan alandan hesaplandı.

Kan kurşun düzeyi ve kemik kurşun düzeyi atomik absorpsiyon spektrofotometrisi (UNICAM 929) ile $\mu\text{g/dL}$ cinsinden ölçüldü.

İstatistiksel analiz için SPSS 10.0 yazılımı kullanıldı. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi ve istatistiksel anlamlılık sınırı $p \leq 0.05$ olarak alındı. Kolmogorov-Smirnov testi ile verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları test edildikten sonra istatistiksel analiz, varyans analizi ile yapıldı.

Bulgular

Kan kurşun düzeyi dişi kontrol grubunda 0.13 ± 0.019 $\mu\text{g/dL}$ iken, deney grubunda 0.14 ± 0.03 $\mu\text{g/dL}$ olarak bulundu. Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). Kemik kurşun düzeyi ise, dişi kontrol grubunda 5.06 ± 1.70 $\mu\text{g/dL}$, deney grubunda 14.2 ± 6.30 $\mu\text{g/dL}$ olarak saptandı. Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). Erkek kontrol grubunda kan kurşun düzeyi 0.065 ± 0.017 $\mu\text{g/dL}$, deney grubunda 0.16 ± 0.04 $\mu\text{g/dL}$ olarak ölçülürken, kemik kurşun konsantrasyonu kontrol grubunda 2.2 ± 0.50 $\mu\text{g/dL}$, deney grubunda 10.6 ± 5.40 $\mu\text{g/dL}$ olarak ölçüldü. Erkek sıçanlarda hem kan kurşun düzeyleri hem de kemik kurşun düzeyleri açısından deney grubu ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Kan ve kemik kurşun düzeylerine cinsiyet faktörünün etkisi incelendiğinde kan ve kemik kurşun düzeyleri açısından deney grubundaki dişi ve erkek sıçanlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p > 0.05$, Tablo 1).

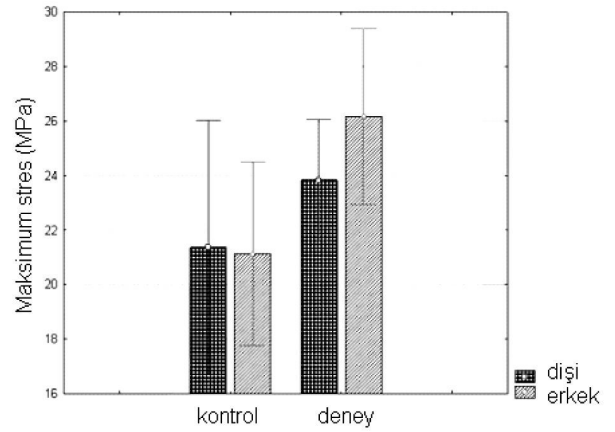
Tablo 1. Deney ve kontrol gruplarında kan ve kemik kurşun düzeyleri ($\mu\text{g/dL}$)

Kurşun düzeyi	Dişi kontrol (n=10)	Dişi deney (n=10)	Erkek kontrol (n=10)	Erkek deney (n=10)
Kan	0.130 ± 0.019	0.140 ± 0.030	0.065 ± 0.017^a	0.160 ± 0.040^b
Kemik	5.06 ± 1.70	14.20 ± 6.30^c	2.20 ± 0.50	10.60 ± 5.40^b

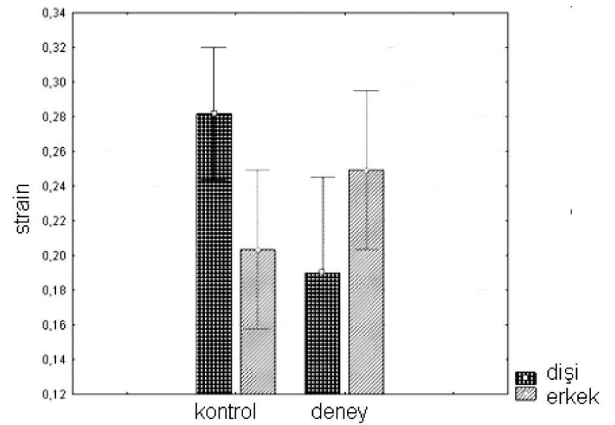
^a $p < 0.05$ (Karşılaştırma erkek ve dişi kontroller arasında yapılmıştır)

^b $p < 0.05$ (Karşılaştırma erkek deney ve kontrol grubu arasında yapılmıştır)

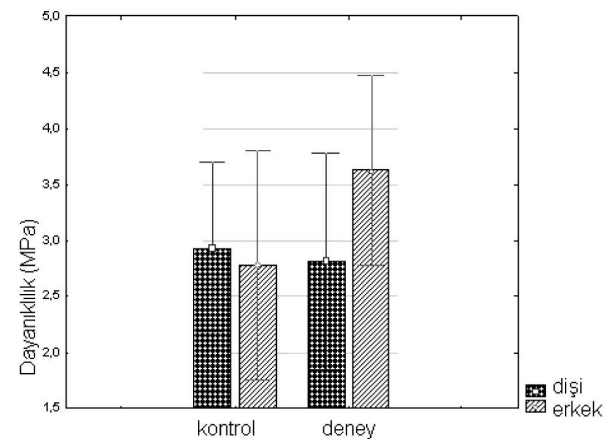
^c $p < 0.05$ (Karşılaştırma dişi deney ve kontrol grupları arasında yapılmıştır)



Şekil 1. Deney ve kontrol gruplarında maksimum stres değerleri



Şekil 2. Deney ve kontrol gruplarında strain değerleri



Şekil 3. Deney ve kontrol gruplarında dayanıklılık değerleri

Biyomekanik değişkenlerden kemiğin intrinsik özelliklerine karşılık gelen stres, strain ve dayanıklılık değerleri belirlendi. Dişi kontrol grubunda maksimum stres 22.22 ± 12.4 MPa maksimum strain 0.27 ± 0.10 , dayanıklılık 3.16 ± 1.98 MPa olarak bulundu. Deney grubunda ise bu değerler sırasıyla 24.36 ± 7.86 MPa, 0.19 ± 0.014 ve 2.73 ± 1.24 MPa olarak hesaplandı. Dişi kontrol ve deney grupları arasında maksimum stres, maksimum strain ve dayanıklılık arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Erkek kontrol grubunda maksimum stres 26.13 ± 13.07 MPa maksimum strain 0.20 ± 0.11 , dayanıklılık 2.77 ± 1.28 MPa olarak bulundu. Deney grubunda ise bu değerler sırasıyla 26.16 ± 9.63 MPa, 0.24 ± 0.09 ve 3.32 ± 1.14 MPa olarak hesaplandı. Erkek kontrol ve deney grupları arasında maksimum stres, maksimum strain ve dayanıklılık arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). Kortikal kemik intrinsik biyomekanik parametreleri üzerine cinsiyet faktörünün etkisi araştırıldığında dişi ve erkek sıçanlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadığı gözlemlendi ($p > 0.05$, Şekil 1-3).

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada çevresel kurşunun kortikal kemik biyomekanik kalitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırma kemik gelişimini ve kemik biyomekaniğini etkileyen faktörlerin cinsiyete göre farklılık gösterme olasılığı nedeniyle hem dişi sıçanlarda hem de erkek sıçanlarda yürütülmüştür.

Sıçanlara verilen günlük 100 mg/kg dozundaki kurşun insanlardaki çevresel kurşun maruziyetine, 5000 mg/kg kurşun ise endüstriyel kurşun maruziyetine karşılık gelmektedir (16). Bu çalışmada çevresel olarak maruz kalınan kurşunun kortikal kemik kalitesi üzerine etkileri incelendiğinden günlük doz 100 mg/kg olarak seçilmiştir. Sıçanlardaki 50 günün insanlardaki 4 yıllık bir zaman periyoduna karşılık geldiği bilindiğinden (10), 10 haftalık uygulamanın, kemikteki değişikliklerin izlenmesi açısından yeterli olacağı düşünülmüştür.

Düşük doz kurşunun kemik üzerine etkisi çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Ancak bu çalışmalar daha çok morfolojik, histomorfometrik ve dansitometrik çalışmalardır (10,17). Escibano ve arkadaşları tarafından gelişme çağındaki ve yetişkin sıçanlarda yapılan bir çalışmada, sıçanlara 50 gün boyunca 17 mg/kg kurşun yemle birlikte verilmiş ve femur boyu ile 5. lumbar vertebranın boyu ölçülmüştür. Çalışma sonunda femur boyunda herhangi bir değişiklik gözlenmezken, kurşun verilen grupta lumbar vertebranın boyunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli miktarda azalma olduğu belirtilmiştir. (10). Jamieson ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, gelişme dönemindeki sıçanlara, 200 mg/L dozundaki kurşun içme suyuyla birlikte verilmiş ve kurşun verilen sıçanlarda iskelet gelişiminde gecikme ile kemik mineral yoğunluğunda

azalma gözlenmiştir (17). Düşük doz kurşunun kortikal kemiğin intrinsik biyomekanik özellikleri üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya ise rastlanmamıştır. Bu nedenle sonuçları karşılaştırma olanağı olmamıştır.

Stres, strain ve dayanıklılığın kemiğin kollajen içeriği ile ilişkili olduğu ve bu değişkenlerdeki azalmanın kemiğin kollajen içeriğindeki azalmayla ya da kollajenin yapısında oluşan bozulmayla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (13). Bu bilgiler ışığında bu çalışmada kurşun verilen gruptaki stres, strain ve dayanıklılık değerlerinin kontrol grubuna göre farklı olmaması, uygulanan doz ve süredeki kurşunun kemiğin kollajen miktarında ve yapısında herhangi bir değişikliğe yol açmadığını şeklinde yorumlanmıştır. Literatürde kurşunun kemiğin önemli yapısal elementlerinden kollajeni nasıl etkilediğine dair bilgiler oldukça sınırlıdır. Kültüre edilmiş kemik hücrelerinde yapılmış bir çalışmada bu ağır metalin protein sentezini ve özellikle de Tip I kollajen yapımını azalttığı öne sürülmüştür (18).

Kan kurşun düzeyi ve kemik kurşun düzeyi de kurşunun organizmadaki etkilerinin ortaya çıkmasında önemlidir (6). Çalışmamızda dişi sıçanlarda kan kurşun düzeyi ve kemik kurşun düzeyi açısından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmazken, erkek sıçanlarda bu fark önemli bulunmuştur. Ancak her iki cinsiyette de kan ve kemik kurşun düzeylerinin kemiğin biyomekanik kalitesini etkileyecek düzeyde olmadığı düşünülmüştür.

Sonuç olarak 10 hafta boyunca maruz kalınan günlük 100 mg/kg dozundaki kurşunun, sıçan kortikal kemiğinin intrinsik biyomekanik özelliklerinde istatistiksel olarak önemli bir değişikliğe neden olmadığı, cinsiyet faktörünün de sonuçları etkilemediği gözlenmiştir.

Kaynaklar

1. Ögenler O. Kurşun zehirlenmesinin kemiğin elastik özellikleri üzerine etkileri. Yüksek lisans tezi, 2004:3-5.
2. WHO. Major poisoning episodes from environmental chemicals. Geneva, 1992:3-15.
3. Hızal S, Şanlı C. Çocuklarda beslenme ve kurşun etkileşimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2006;49:333-8.
4. Lanphear BP, Winter NL, Apetz L, Eberly S, Wietzman M. A Randomized Trial of the effect of dust control on children's blood lead levels. *Pediatrics* 1996;98(1):35-40.

5. Hu H. Knowledge of diagnosis and reproductive history among survivors of childhood plumbism. *Am J Public Health* 1991;81(8):1070-2.
6. Goyer RA, Clarkson TW. Toxic effects of metals. Klassen CD. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 6th Ed. New York: Mc Graw Hill, 2001:811-67.
7. Pounds JG, Long GJ, Rosen JF. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1991;29(5):308-11.
8. Berglung M, Akesson A, Bjellerup P, Vahter M. Metal bone interactions. *Toxicol Lett* 2000;112-3: 219-25.
9. Puzas JE, Sickel MJ, Felter ME. Osteoblasts and chondrocytes are important target cells for the toxic effects of lead. *Neurotoxicology* 1992;13(4):783-8.
10. Escribano A, Revilla M, Hernandez ER, Seco C, Gonzalez-Riola J, Villa LF, Rico H. Effect of lead on bone development and bone mass: A morphometric, densitometric and histomorphometric study in growing rats. *Calcif Tissue Int* 1997;60:200-3.
11. Lyn Patrick ND. Lead toxicity, A review of the literature. Part I: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev* 2006;11(1):2-22.
12. Silbergeld EK. Lead in bone: Implications toxicology during pregnancy and lactation. *Environ Health Perspect* 1991;91:63-70.
13. Burr DB. The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone* 2002; 31(1):8-11.
14. Çömelekoğlu U, Ogenler O, Bagis S, Yıldız A. Effect of high-dose lead acetate on cortical bone quality in a rat model. *Toxicol Ind Health* (Baskıda)
15. Nigg BM, Herzog W. Introduction. Nigg BM, Herzog W. Biomechanics of the musculo-skeletal system, 2nd Ed. New York: John Wiley & Sons, 1999:1-35.
16. Gruber HE, Gonick HC, Khalil-Manesh F, Sanchez TV, Motsinger S, Meyer M, Sharp CF. Osteopenia induced by long-term, low-and high-level exposure of the adult rat to lead. *Miner Electrolyte Metab* 1997;23(2):63-75.
17. Jamieson JA, Taylor CG, Weiler HA. Marginal zinc deficiency exacerbates bone lead accumulation and high dietary zinc attenuates lead accumulation at the expense of bone density in growing rats. *Toxicol Sci* 2006;92(1):286-94.
18. Todorovic T, Dozic I, Vujanovic D, Pejovic J, Marjanovic M. The influence of chronic lead poisoning on the activity of some serum enzymes in rats. *Acta Veterinaria (Beograd)* 2005;55(5-6):471-82.