

TURNIKE UYGULAMASINDA E VİTAMİNİN KIKIRDAK DOKUSU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Erol YALNIZ^a, Hakan GÜRBÜZ^b, Erkan YAMAK^c, Selçuk BİLGİ^d,
Aydın AKGÜN^e

ÖZET

Bu çalışmada; sıçanlarda E vitamini uygulamasının, gerek reperfüzyon travmasına uğramış kıkırdak dokusuna ve gerekse travmatize edilen kıkırdak dokusunun rejenerasyonuna olan etkilerini araştırdık. Sıçanlar, deney ve kontrol olarak iki gruba ayrıldılar. Deney grubuna cerrahi girişim öncesi 7 gün süreyle, 100mg/kg/gün alfa D-tokoferol asetat yapıldı. Kontrol grubuna ise, herhangi bir ilaç verilmedi. 2 saatlik turnike uygulamasını takiben turnikeler açılarak reperfüzyon sağlandı. Turnike açıldıktan 1 saat sonra, malondialdehit miktarı ölçümek üzere sinovyal doku örneği alındı. Turnike uygulaması sırasında heriki gruptaki hayvanların, medial femoral kondil kıkırdağı üzerinde, subkondral kemije ulaşmayan bir defekt yaratıldı. İşlem sonrası 3. haftada sıçanlar öldürülü ve eklem kıkırdakları incelendi. İstatistikî açıdan anlamlı bir şekilde malondialdehit miktarları düşük bulunan ($p<0.001$) deney grubunda; normal eklem kıkırdağında hasarın kontrol grubuna göre çok az olduğu, travmatize edilen bölgede ise kıkırdak iyileşmesinin, kontrol grubuna göre daha iyi olduğu görüldü.

Bu bulgular, E vitamininin reperfüzyon travmasının zararlı etkilerine karşı eklem kıkırdağını koruduğunu ve kıkırdak iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: E vitamini (Alfa D-tokoferol), reperfüzyon travması, malondialdehit, kıkırdak

SUMMARY

THE EFFECT OF THE VITAMINE E ON THE CARTILAGE IN THE APPLICATION OF A TOURNIQUET

In this study, we investigated the effect of the vitamine E on the cartilage that damaged by ischemi-reperfusion trauma and healing of the injured cartilage. Rats were divided as a study (Group 1) and control (Group 2) groups. The alpha D-tocopherol (100 mg/kg/day) were given to animals in Group 1 for 7 days before the operation. No drugs were given to animals in Group 2. The tourniquet were applied and maintained for two hours, samples of synovia were taken an

^a Yrd. Doç. Dr., T.Ü. Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, EDİRNE

^b Uzm. Dr., T.Ü. Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, EDİRNE

^c Araştırma Gör. Dr., T.Ü. Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, EDİRNE

^d Yrd. Doç. Dr., T.Ü. Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, EDİRNE

^e Araştırma Gör. Dr., T.Ü. Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı, EDİRNE

hour after release of the tourniquet for detecting the amount of malondialdehit. In the period of application of the tourniquet , cartilage defect were made on the medial femoral condyle. All animals were killed after 3 weeks and the joint cartilage examined histologically. In Group 1, the amount of malondialdehid were less than ($p < 0.001$) Group 2, cartilage damage were not severe as in Group 2 and the regeneration of cartilage were better in the cartilage defect.

These results suggest that ischemia-reperfusion injury leads to increased oxygen free radicals in synovia. Oxygen free radicals play a role in the injury of the cartilage. Vitamin E protects the joint cartilage to reperfusion injury and improves the healing process after cartilage injury.

Key words: Vitamin E (alpha D tocopherol), reperfusion injury, malondialdehyde, cartilage.

GİRİŞ

Eklem kıkırdağı, dağınık bir şekilde bulunan kondrositler ve bunların çevresinde oldukça organize, su oranı yüksek olan ağımızı bir yapıdan oluşmuştur (1). Üç çeşit proteinden oluşur. Birincisi kıkırdağın temel yapısını oluşturan kollajenlerdir. İki tip kollajen mevcuttur; biri kıkırdağın tensil gücünü veren Tip II kollajen ve diğer yapılışmada düzenleyici ve yapının devamlılığını sağlayan, miktarda çok düşük olan minor kollajendir. İkinci çeşit protein olan proteoglikanlar, dokuda su tutarak kompresyona direnci ve dayanıklılığı sağlarlar. Üçüncü protein nonkollajen ise, organizasyon ve matriks stabilizasyonundan sorumludur (2).

Pluripotent mezenşim hücrelerinin oksijensiz ortamda oluşturdukları kıkırdak dokusu; yaşamının idamesini sinoyanın oluşturduğu eklem sıvısı ile sağlar (3). Bu çalışmada, eklem kıkırdağının yaşaması için gereksinim duyduğu sinovyal dokuda, reperfüzyon travması ile oluşan serbest oksijen radikallerinin varlığı, bunun dolaylı olarak kıkırdağa olan etkisi ve E vitamininin koruyucu özelliği araştırıldı.

MATERİYAL VE METOD

Çalışmada 250-300 gr ağırlığında Albino-Wistar cinsi sincanlar kullanıldı. Cinsiyet ayrimı yapılmadı. Deney ve kontrol grupları beşer adet sincandan oluşturuldu. Deney grubundaki sincanlara cerrahi işlem öncesi, 7 gün süreyle günde tek doz (İM) 100 mg/kg alfa D-tokoferol asetat verildi. Kontrol grubundakilere ise herhangi bir ilaç verilmedi.

Anestezi Ketalar (Ketamin hidroklorür) ve Rompun (Xylazin) ile sağlanıktan sonra her iki gruptaki tüm sincanların alt ekstremitelerine, 2 saat süreyle turnike uygulandı. Turnike uygulaması esnasında her iki diz eklemine medial parapatellar insizyonla girilip, medial femoral kondilin eklem yüzünde subkondral kemije ulaşmayan bir defekt oluşturuldu. Lateral femoral kondil yüzeyinde ise, herhangi bir cerrahi işlem uygulanmadı. Ortalama olarak 10 dakika süren bu cerrahi işlem sonunda, geçici 2 sütur ile saha kapatıldı. Turnike 2 saatlik süre sonunda, tüm deneklerde açıldı ve anestezi altında 60 dakika daha beklenildi. 60.dakikada geçici sütürler açıldı ve

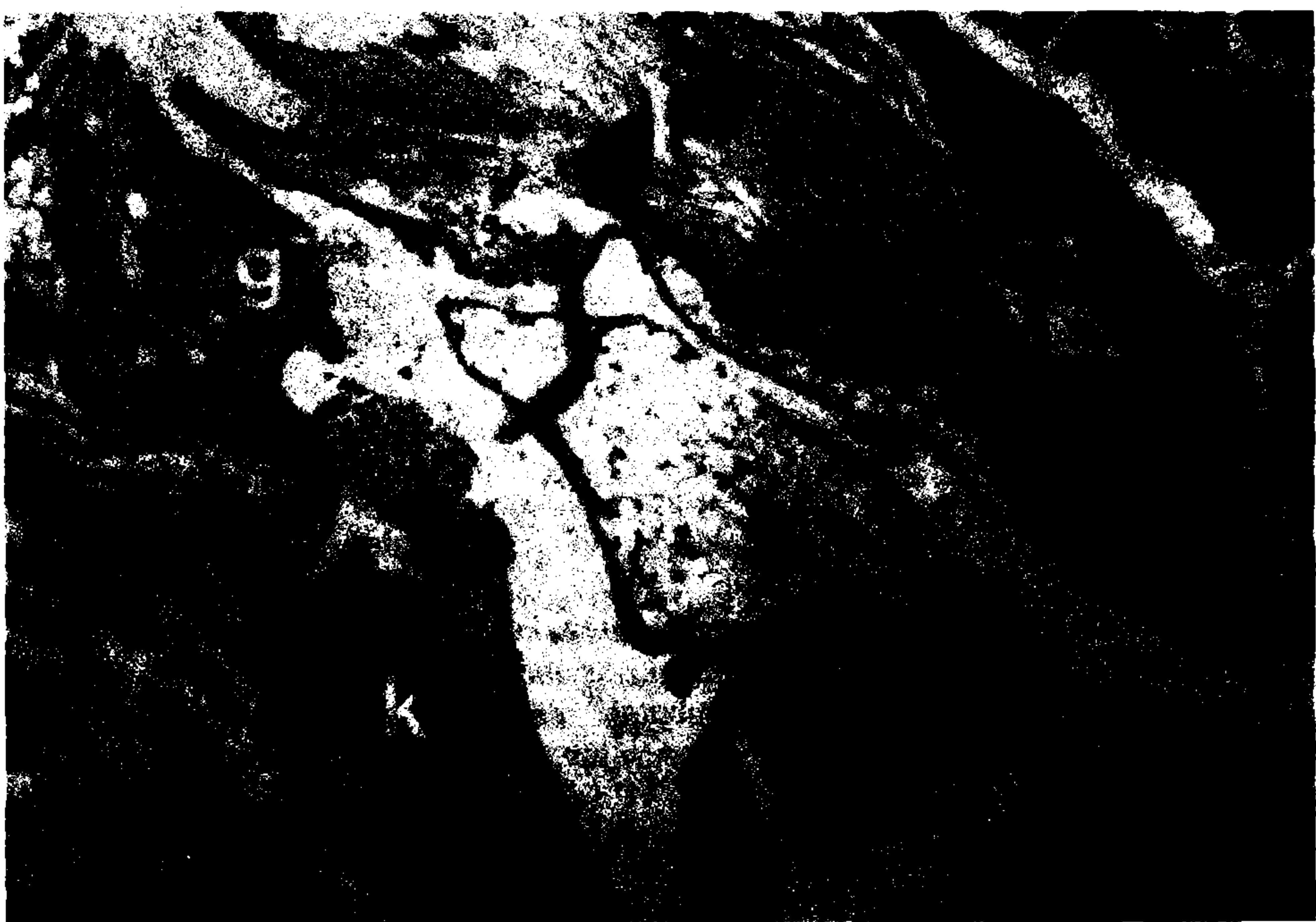
Tablo I. Sıçanların diz eklemi sinovyalardan elde edilen malondialdehit miktarları.

	DENEY *		KONTROL *	
	Sağ diz	Sol diz	Sağ diz	Sol diz
1. Sıçan	3120	3900	17360	17720
2. Sıçan	4680	3744	17360	9360
3. Sıçan	4212	3460	15600	12480
4. Sıçan	2730	4836	16848	10196
5. Sıçan	4836	6434	14040	15600

* Sonuçlar, n.mol/gr. cinsinden verilmiştir.

sinovyadan malondialdehid tespiti için doku parçası alındı. Bu işlemi takiben ameliyat sahası kapatıldı.

Sıçanlar kafeslerinde 3 hafta bekletildi. 3. hafta sonunda öldürülüp, kıkırdak ve sinova doku örnekleri patolojik inceleme için alındı.



Resim I: Eklem yüzeyinde düzensizlik ve sinovyal reaksiyon. Kıkırdak dokusu düzensiz ve defektli olup yüzeyinde sinova epители ile örtülü granülasyon dokusu mevcuttur. g : granülasyon dokusu , k : kıkırdak dokusu , s : sinova . (H+E x40).

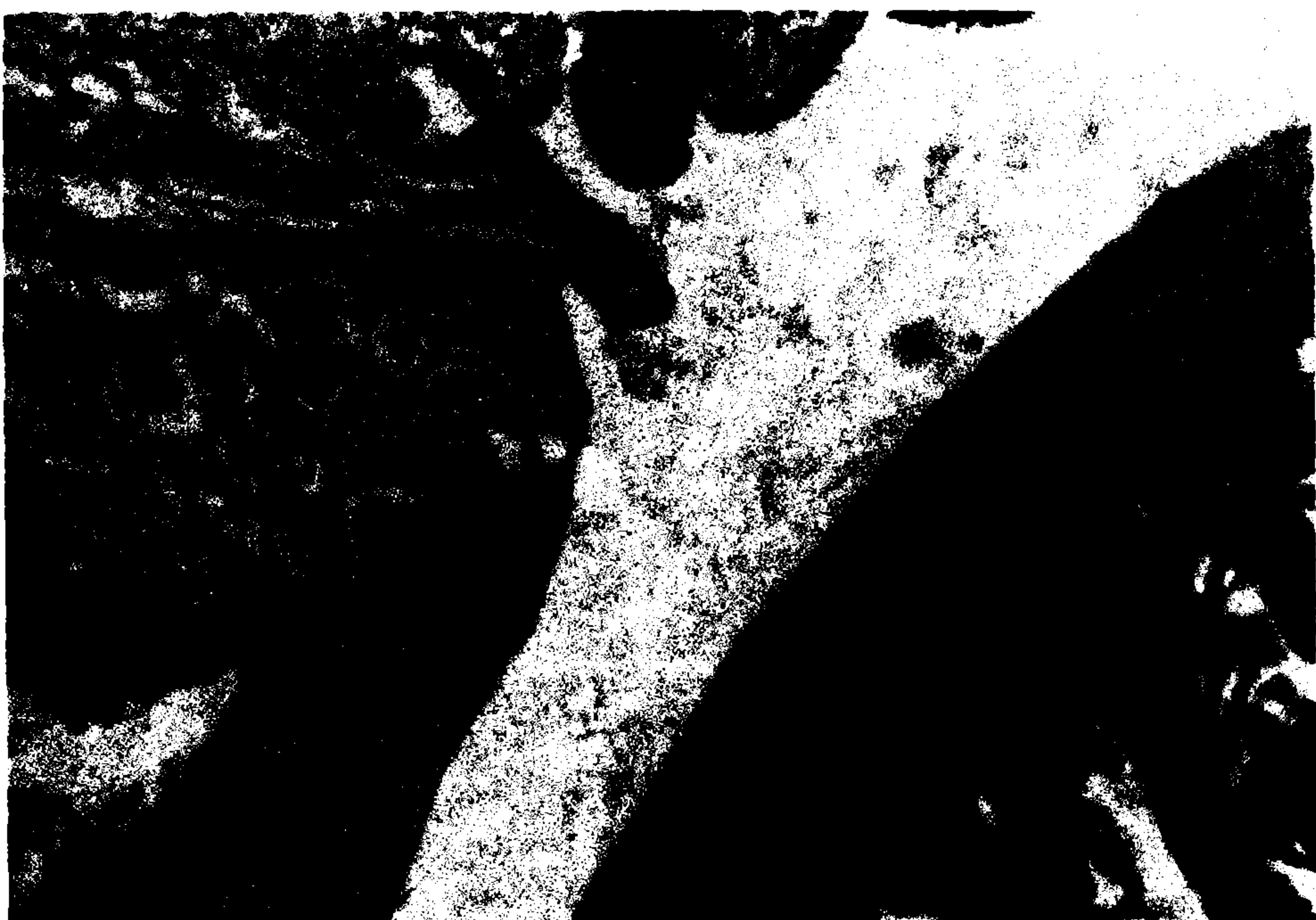


Resim II: Kıkırdak yüzeyinde, kontrol grubuna göre daha düzenli görünüm ve iyileşmenin defektı dolduran organize granülasyon dokusu ile seyrettiği gözlenmektedir. g : granülasyon dokusu , k : kıkırdak dokusu. (H+E x40)

SONUÇLAR

Turnike açıldıktan 60 dakika sonra alınan sinovya doku örneklerinde, tiyobarbütrik asit yöntemiyle malondialdehid miktarı araştırıldı (4). Deney ve kontrol grubunun malondialdehid miktarları nmol/gr cinsinden Tablo I'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, deney grubu sonuçlarının, kontrol grubuna göre düşük olduğu görüldü. Sonuçlar "Student'in t testi" ile kıyaslandığında istatistikî açıdan anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlar; deney grubunda daha az serbest oksijen radikalı aktivasyonuna bağlı malondialdehit oluşmasının, E vitamini kullanılmasına bağlı olduğunu bize düşündürmüştür.

Operasyondan 3 hafta sonra alınan kıkırdak biopsilerinin histolojik incelemesinde, kontrol grubunda medial femoral kondil eklem kıkırdığının düzensiz olduğu ve defekt alanının sinovya epiteli ile örtülü granülasyon dokusu ile dolduğu görüldü (Resim I). Buna karşılık, deney grubu medial femoral kondil kıkırdak yüzeyinin daha düzenli olduğu, kondrosit populasyonun normal olduğu ve defektin vaskularize, aktif bir granülasyon dokusu ile dolduğu gözlenmektedir (Resim II).



Resim III:Eklem yüzeyinin düzgün olmasına karşı, yer yer subkondral kemiğe kadar uzanan sahalarda kıkırdak hücrelerinin nükleusları koyulaşmış, küçülmüş ve kıkırdak kalınlığı azalmıştır. (H+E x100)

Kontrol grubu, lateral femoral kondil kıkırdağının incelemesinde, eklem yüzeyinin düzgün olmasına karşı, yer yer subkondral kemiğe kadar uzanan sahalarda kıkırdak hücrelerinin nükleuslarının küçüldüğü ve kıkırdak kalınlığının azaldığı gözlandı. (Resim III). Deney grubu lateral femoral kondil eklem kıkırdağının ise yüzeyinin düzgün, kondrositlerin aktif, eklem aralığının oldukça düzenli olduğu izlendi (Resim IV).

TARTIŞMA

Son yörüngesinde eşleşmemiş elektron içeren atom ya da atom gruplarına serbest radikaller denir (4). Serbest oksijen radikalleri özellikle aerob organizmalarda çok önemlidir (5). Normal hücre metabolizmalarında oluşsalar da, defansif mekanizmalarla, hücreye zarar vermeden yok edilirlər (6).

Serbest oksijen radikalleri, proteinleri denatüre ederek, ATP sentezini bozarak ve membran lipidlerinin peroksidasyonu yoluyla hücre yıkımına neden olurlar (7, 8, 9).



Resim IV: Kıkırdak yüzeyler düzgün, kondrositler aktif, eklem aralığı oldukça düzenli olarak gözlenmektedir. (H+E x100)

Serbest oksijen radikallerinin dokuda direk tespiti zor ve zahmetlidir (10). Bu nedenle serbest oksijen radikallerinin lipid peroksidasyonu etkileri sonucu oluşturdukları hücre içi malondialdehit miktarlarının, tiyobarbutirik asit yöntemiyle hesaplanması yöntemi tercih edilir. Böylelikle, serbest oksijen radikalı indirekt bir yöntem ile saptanmış olur (11). Yapılan çalışmalarda, turnike sonrası çeşitli zaman dilimlerinde alınan doku örneklerindeki malondialdehid miktarının en yüksek seviyeye 60. dakikada ulaştığı bulunmuştur (12). Biz de çalışmamızda, turnike açıldıktan 1 saat sonra malondialdehid tespiti için doku örneği aldık.

Dokunun belli bir süre iskemide kalması ve bunu takiben tekrar kanlanması, dokuda bir travma yarattığı gösterilmiştir ve bu olaya "reperfüzyon travması" denmektedir. İskemi süresince, ATP stogu hipoksantin'e dönüşmekte, ondan da proteazlar oluşmaktadır. Reperfüzyon safhasında ortama gelen oksijen de, serbest oksijen radikal oluşumuna neden olmaktadır (13).

Serbest oksijen radikalının kıkırdaktaki yıkıcı etkisi çeşitli yöntemlerle gösterilmiştir. 1981 de Burchardt ve ark. (14), 1987 de Klamfeldt ve ark. (15), 1991 de Vincent ve ark. (16), 1992 de Michael ve ark. (17) ile Larsen ve ark. (18), kıkırdak

hücre kültürü çalışmaları serbest oksijen radikallerinin kıkırdak gelişimini bozucu, direnci kırcı ve rejenerasyonu geciktirici etkilerini göstermiştir. Bu çalışmalarla, hücre kültürü ortamına özellikle hidrojen peroksit gibi çeşitli serbest oksijen radikalleri ya da radikal temizleyici ilavesi ile serbest oksijen radikalının kıkırdak üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

E Vitamini antioksidan olarak ta bilinir (5). Membran stabilizasyonunu koruyucu ve lipid peroksidasyonunu engelleyici bir etkiye sahiptir (19, 20). Yüksek lipid çözünürlüğü nedeniyle kolayca membran fosfolipidleri arasına girmekte ve 20 karbonlu doymamış yağ asitlerini redükte ederek, serbest oksijen radikallerinin biomembranlarda geliştireceği lipid peroksidasyonunu önlemektedir (21). Ayrıca E vitamini, serbest oksijen radikalleri ile birleşerek tokoferol kuinona dönüşmektedir. Oluşan bu yeni bileşik, serbest oksijen radikal etkinliğinin bozulmasını sağlayarak temizleyici işlev göstermektedir. Tokoferol kuinon bileşiginin yine, lipid peroksidasyonunu ve trombosit agregasyonunu inhibe edici etkisi vardır (5, 22, 23, 24).

Deney grubunda serbest oksijen radikalının miktarca daha az olması ve aktivitesinin düşüklüğü, E vitamini uygulamasının bir sonucu olduğu şeklinde yorumlandı.. E vitaminini deney öncesi kullanmadızın nedeni ise vitaminin etkisini, uzun süreli kullanımlardan sonra göstermesidir (21).

Sinovya, kıkırdak dokuda normal yaşamın idamesi ve yaralarının sarılması için çok önemli role sahiptir. Özellikle, subkondral kemige ulaşmayan kıkırdak harabiyetlerinin iyileşmesinde primer faktör sinoviadır (2). Sinovyanın salgılanlığı eklem sıvısı kıkırdağın beslenmesi için şarttır. 1989 da Mitchell ve ark. (25), yaptıkları artrotomilerde süreye bağlı olarak, eklem yüzeyinin kurumasıyla gelişen kıkırdak harabiyetini göstermişlerdir.

Bu çalışmada, turnike uygulamasıyla iskemi ve ardından turnike açılarak, reperfüzyon travması oluşturulmuştur. Reperfüzyon travması oluşumundaki ana etken olan serbest oksijen radikallerinin, sinovyal dokunun fonksiyonlarını bozarak, kıkırdak dokusu üzerinde zararlı etkisi olduğu ve kıkırdağın rejenerasyonunu bozduğu gösterilmiştir. E vitamininin kıkırdağı oksijen radikallerinin etkisine karşı koruyucu rolü olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Buckwalter J.A., Rosenberg L.C., Hunziken E.: Articular Cartilage Composition structure, Response for injury and Methods of Facilitating Repair. In Ewing JW (ed) : The science of Arthroscopy., New York ,Raven Press , 1990, pp 19-56.
2. Charles A., Rockwood J., David P.G., Robert W.B.: Fractures in adults. JB Lippincott Company, Philadelphia, 1991, pp 207-210.
3. Michel C., Vincent F.: Toxic effects and deflection of oxygen free radicals on cultured articular chondrocytes generated by menadione. Free Radic Res Commun. 17(4): 279-289, 1992.

4. Schidley JW: *Free Radical in central nervous system ischemia.* Stroke. 21(7):1086-1090, 1990.
5. Butterikas C., Beahner R., Baer L.: *Vitamin E selective inhibitor of the NADPH oxidoreductase enzyme system in human granulocytes.* Am J Path. 112: 287-293, 1983 .
6. Irwin F.: *The biology of oxygen radicals.* Science . 201: 875-880, 1990.
7. Braugler J.M., Hall E.D.: *Central nervous system. Trauma and stroke. 1. Biochemical consideration for oxygen radical formation and Lipid peroxidation.* J Free Radic Biol Med. 6: 289-301, 1989.
8. Myung S.K., Tai A.: *O₂ Free Radicals; Cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na⁺ - K⁺ ATPase.* Am J Physiol. 252 -257, 1987.
9. Stewen W.W., Benedict R.L.: *Leucocytes oxygen radicals and myocardial injury due to ischemia and reperfusion.* Radical Biology and Medicine. 4: 31-37, 1988.
10. Pryor W.A., Prier D.G., Chirc D.F.: *Electron spin resonance study of main stream and side stream cigarette smoke nature of the free radicals in gaseous smoke and in cigarette .* Environ Health Perspect. 47: 345-355, 1983.
11. Casini A.F., Ferrati M., Pomella A.: *Lipid Denoxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice.* Am J Path. 123:520 - 531, 1986.
12. Saunders R.D., Dugan LL., Demedruck P.: *Effects of methylprednisolone and combination of alfa-tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatised spinal cord tissue.* J Neurochem 49: 24-31, 1987.
13. Cord J.M.: *Oxygen derived free radicals in post ischemic tissue injury.* Eng Med. 312: 159-163, 1985.
14. Burkhardt H., Schwingel M., Menninger H.: *Oxygen radicals as effectors of cartilage destruction. Direct degradative effect on matrix components and indirect action via activation of latent collagenase from polymorphonuclear leukocytes.* Arthritis Rheum. 29 (3): 379-387, 1986.
15. Klamfeldt A., Manklund S.: *Enhanced breakdown in vitro of bovine articular cartilage proteoglycans by conditional synovial medium. The effect of superoxide dismutase and catalase.* Scand Rheumatol. 16 (1): 41-45, 1987.
16. Vincent F., Connal M., Deter M.: *Effects of oxygen free radicals on articular chondrocytes in culture.* Exp Cell Res. 192 (2): 333-339, 1991.
17. Michael H.R, Lynn JR.: Histology. Second ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 1989, pp 123-138.
18. Larsen N.E., Lombard K.M., Parent E.G.: *Effects of hyaluronic acid on cartilage and chondrocyte cultures.* J Orthop Res. 10 (1): 23-32, 1992.
19. Skharmano AT, Aidakhanov, Kurmangaliou SM: *Effects of vitamin E deficiency or oxidative. Metabolism and antioxidant enzym activity of macrophages.* Ann Nutr Metab 34: 143-140, 1990.

20. Tappel A.L.: *Vitamin E as biological lipid antioxidant.* Vitam. Hormones. 20: 493-510, 1962.
21. Yamato M., Shima T., Vazumi T.A.: *Possible role of lipid peroxidation in cellular damages. Caused of alfa-tocopherol administration.* Stroke. 14 : 977-982, 1983.
22. Chen L.H., Boissonneault G.A., Glavent H.B.: *Vitamin C, vitamin E and cancer.* Anticancer Res. pp 789-798, 1988.
23. Douglas C.E., Chan A.C., Chay P.C.: *Vitamin E inhibits platelet phospholipase A₂.* Biochim biophys Acta. 876: 639-645, 1986.
24. Erin A.N., Spirin M.M., Tabidze L.U.: *Formation of alpha-tocopherol complexes with fatty acids: A hypotheticil mechanizm of stabilization of biomembranes by vitamin E.* Biochem Biophys Acta 774:96-102, 1984.
25. Nelson M., Nora S.: *The deleterious effect of drying on articular cartilage.* J Bone Joint Surg. 71 A : 89-95, 1989.