

ANABOLİZAN ve D VİTAMİNİNİN AYRI AYRI VE KOMBİNE OLARAK TATBİKİNİN PRİMER CALLUS ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İN VİTRO OLARAK TETKİKİ

Dr. Cengiz OKTAY*
Dr. Ömer KAYA**

Ö Z E T

Bu araştırmada, fare fibulasında meydana getirilen kırığın primer callus teşekkülü devresinde, tatbik edilen muhtelif preparatların callusa olan etkileri incelenmiştir.

Bu preparatlardan, Anabolizanların callustaki hücresel aktiviteyi artırdığı, Anabolizan ve D₃ vitamini kombinasyonunun, mitotik aktiviteyi inhibe ettiği bulunmuştur.

Konu ile ilgili genel bilgiler:

Kırık iyileşmesinde Anabolizan, C vitamini kombinasyonunun primer callus devresinde olumlu neticeler verdiğini bilmekteyiz (1). Bu araştırmanın bir parçası olarak Anabolizan ve D vitamini'nin ayrı ayrı ve kombine bir şekilde tatbikini primer callus teşekkülü üzerinde ne gibi etki meydana getireceğini değerlendirdik.

Anabolizanlar kemik ve adele dokusu üzerinde nitrogen, po-

tasyum, fosfor ve kalsiyum retansiyonu yaparak etkili olurlar. Anabolizanların protein sentezindeki rolü arttırıcı protein katabolizmasındaki rolleri ise katabolik aktiviteyi inhibe edici yöndedir.

Kırık görülen vak'alarda anabolizanların kondroblastik mitozu arttırıcı yönde etki ettikleri bilinmektedir (1). Bu durum muhtemelen hücre içi protein sentez potansiyelinin artmasına

(*) Atatürk Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Doçenti.

(**) Aynı Fakültede doktor asistanı.

ve binnetice kondroblastik mitoz potansiyelinin yükselmesine bağlıdır. D₃ vitamininin sitrat sentez üzerinde rol oynadığı yönünde inanışlar mevcuttur (2). Dikshit ve diğerleri (3) D₃ vitamininin bir coenzim rolü oynadığı kanaatinde dirler. D₃ vitaminiyle paratiroid hormonu arasında karşılıklı bir ilişki söz konusudur. Bu ilişki sitrat sentezini pozitif yönde etkileyip aşırı D₃ vitamini yüklemesi yapıldığında aşırı sitrat sentezine bağlı olarak kemik kalsiyumunun mobilize edilmesini sağlar. Aşırı D₃ tatbikinde sitrat seviyesinin yükselmesinin yanı sıra diğer organik asitlerin seviyelerinin de yükseldiği gösterilmiştir. (4).

Kemikteki sitrat sentezinin D₃ vitamininin tatbikinde yükselmesinin yanı sıra, serum sitrat seviyesinin yükselmesinde kemik sitrat seviyesinin de yükselmesi bahis konusudur. Bu durum, tipik olarak serum fosfat seviyesinin normalin altına düşmesi halinde görülür (4).

Rasmussen'in (5) D₃ vitamini ile ilgili olarak yaptığı muhtelif araştırmalarda, fizyolojik limitlerin altında alınan D₃ vitamininin osteoblast, osteoklast hücreleri ile osteoid dokuda bir değişiklik meydana getirmediği, D₃ vi-

tamininin yüksek dozlarda verilmesi halinde ise sadece epifiz plağında bir kalınlaşma olduğu tesbit edilmiştir. Bu durumun da epifizyel plağın mineralizasyonundaki gecikmeye bağlı bulunduğu tesbit edilmiştir.

D₃ vitamini kalsiyumun bağırsaklardan absorpsiyonunda muhtemelen taşıyıcı rolü oynamaktadır. Kalsiyumun bağırsaklardan absorpsiyonunda D₃ vitamininin yanı sıra lysine ve arginin gibi amino asitler de rol oynamaktadırlar (4). Kalsiyum absorpsiyonunun bozulduğu durumlarda plazma kalsiyum seviyesinin normalin altına düştüğü görülür. İnsandaki plazma kalsiyum seviyesi, plazma fosfat seviyesi ile yakın bir ilişki gösterir. Bu seviye paratiroid ve thyrocalcitonin gibi antagonizm gösteren hormonlar ile dengelemektedir. D₃ vitamininin fazla dozları muhtemelen paratiroid aktivitesi paralelinde bir fonksiyon görmektedir (5). Callus'un mineralizasyon sürecinde rolü olduğuna inandığımız D₃ vitamininin, nabolizanlarla beraber veya ayrı olarak verilmesinin callus organik matriksi üzerinde bir rolü olup olmadığını tetkik maksadı ile bu araştırmaya girilmiştir.

MATERYAL VE METOD

A — MATERYAL

Çalışma, vücut ağırlıkları ortalama 30 gr. olan, dişi ve erkek

20 fındık faresi ile yapılmıştır. Hayvanlar üçü deney grubu, biri kontrol grubu halinde ve 4 grup olarak, her grupta beşer hayvan

bulunmak üzere gruplandırılmışlardır. Gruplarda tatbik olunan preparatlar ve dozlar ile verilme

zamanları Tablo I'de gösterildiği gibidir.

TABLO I
Kullanılan Preparatların Tatbik Şekli

Gruplar	Anabolizan (İ.P.) 67 ng/gm				D Vitamini (İM) 60 Ü/gm			
	1. gün	7. gün	14. gün	21. gün	1. gün	7. gün	14. gün	21. gün
Enjeksiyon Zamanları								
1. Grup	+	+	+	+				
2. Grup					+	+	+	+
3. Grup	+	+	+	+	+	+	+	+
4. Grup Kontrol								

Hayvanların karışmasını önlemek için her gruptaki hayvan aynı yerden dört değişik renk ile boyandı ve araştırma süresince her grup ayrı kafeslerde muhafaza edildi.

B — METOD

Hayvanlara 1 mg/kg hesabı ile Nembutal intra venöz olarak verildi. Enjeksiyonu 5-10 saniye takiben hayvanlar uyku haline girdiler.

İris makası ile uyku halindeki farelerin sağ fibula kemikleri orta yerinden kırıldı. Daha sonra hayvanlar Tablo I'deki 21 günlük tedaviye tabi tutuldular. Kullan-

dığımız anabolizan (Primobolan depot) asitsiz zeytin yağında eritilerek farelere 67 ngm/gm dozunda intra peritonal olarak verildi. D₃ vitamini ise 60/İU/gm dozunda asitsiz yağda eritilerek antramüsküler olarak tatbik edildi.

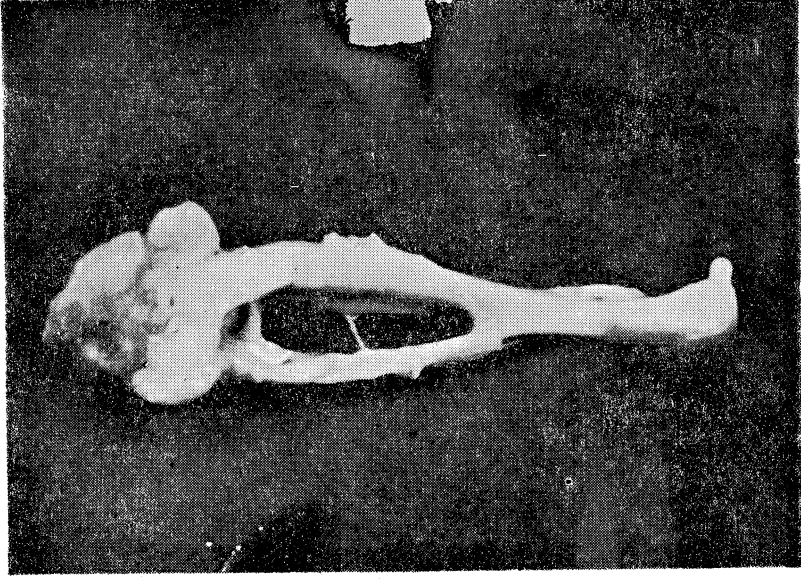
Son enjeksiyonu takiben hayvanlar eter ile öldürüldüler. Sağ fibula tibia kemikleri disseke edilerek çıkartıldı. Makroskopik kontrolden geçirildikten sonra, kemik materyalleri alkolde tesbit olundu. Hiksasyonu takiben, kemikler dekalsifiye edildi. Parafin blokları hazırlandı ve mikroskopik kontrolden geçirildikten sonra, kemik materyalleri alkolde tesbit olundu. Fiksasyonu ta-

kiben kemikler dekalsifiye edildi. Parafin blokları hazırlandı ve mikrotom ile alınan kesitler Hematoxylen-Eosin ve Van-Gieson metodlarına uygun olarak boyan-

dı ve mikroskopik değerlendirmeleri yapıldı.

BULGULAR

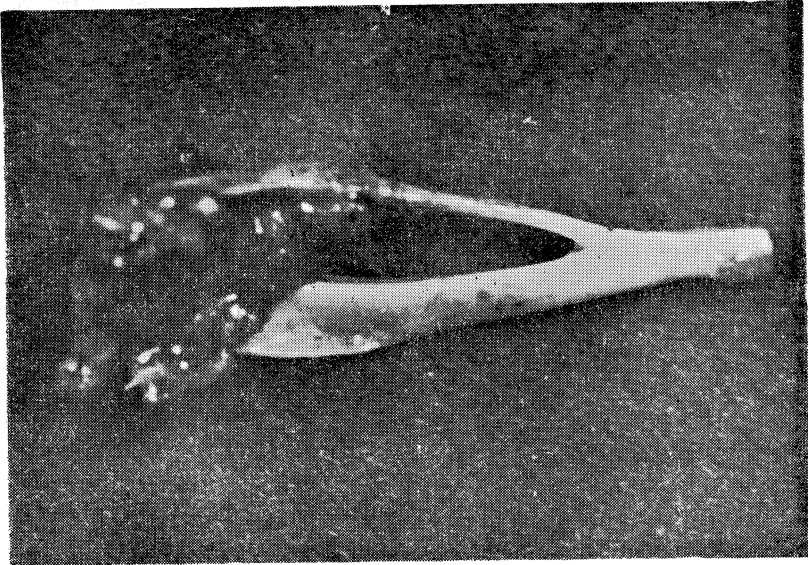
A — Makroskopik Bulgular:



Resim 1: Yalnız anabolizan verilen farelerden birinin fibula kemiği.

Bu farede fragmanlar bir araya gelmiş ve ayrıca muntazam

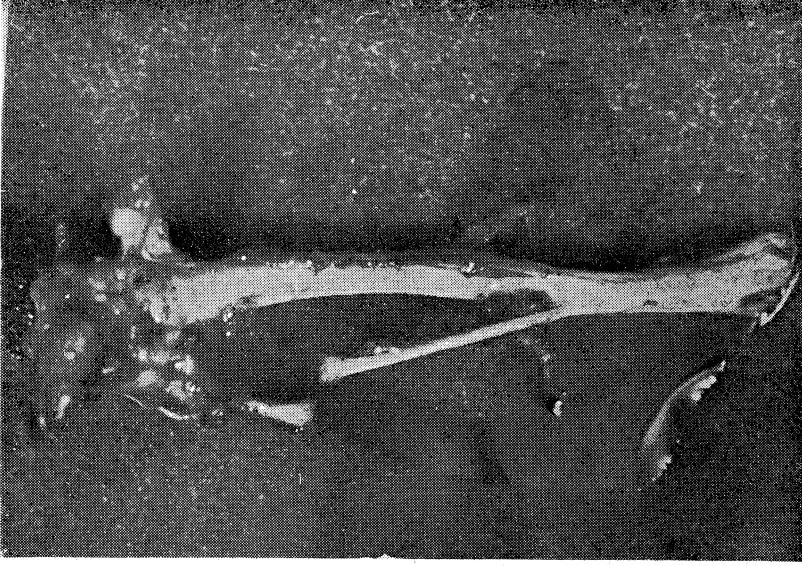
bir kallus teşekkülü olduğu görülmektedir (Resim 1).



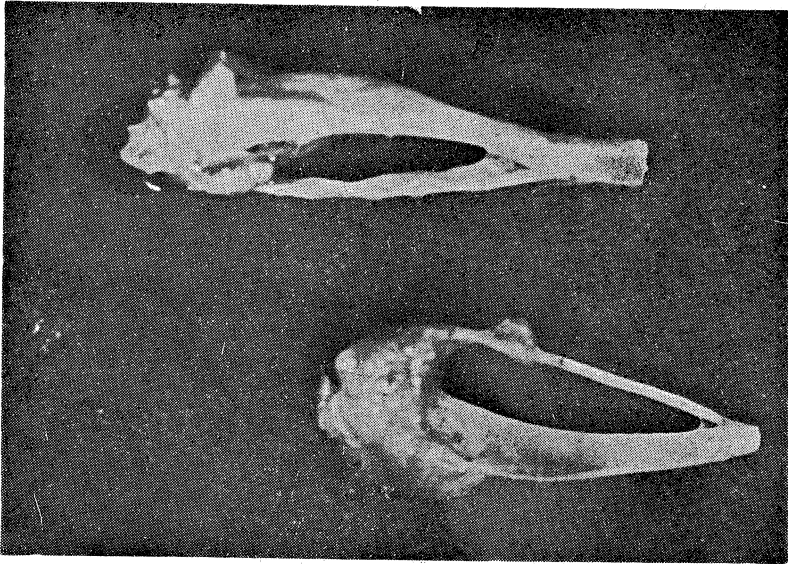
Resim 2: Yalnız D₃ vitamini verilen farelerden birinin fibula kemiği

Kırık parçalarının uç uca kaynaştığı ve aşırı primer callus bulunmadığı aşikârdır (Resim 2).

Fragmanların iyi bir şekilde kaynaşmadığı görülmektedir (Resim 3).



Resim 3: Anabolizan + D₃ vitamininin kombine verildiği farelerden birinin fibula kemiği.

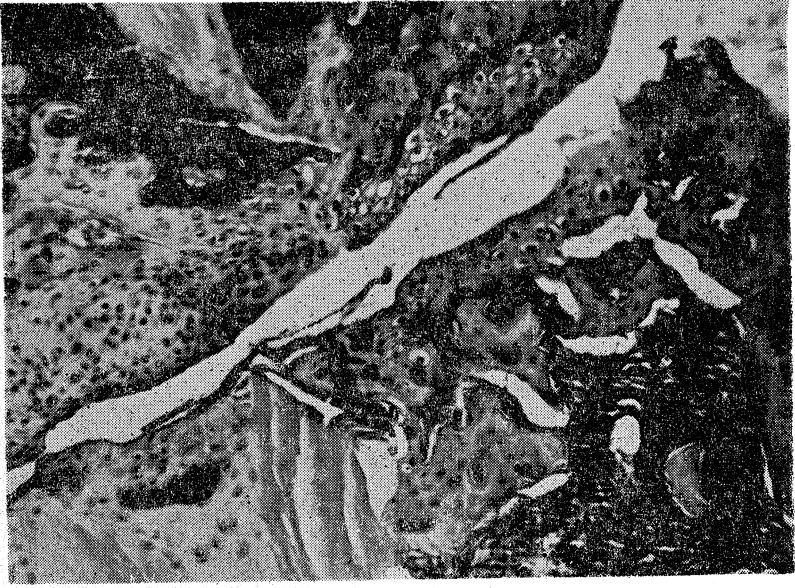


Resim 4: Kontrol grubu farelerinden birinin fibula kemiği.

Kemik fragmanları uc uca gelmiş, kallus yakası çok dar olarak görülmektedir (Resim 4).

B — Histolojik Bulgular

Hücre sayısı açısından en iyi



Resim 5: Yalnız anabolizan verilen farelerden hazırlanan preparat (H+E).

gelişmiş preparat, bu preparattır. Kondrositler adeta sırt sırta vermiş görünümündedirler. Aralarında çok az hücreler arası madde olduğu görülmektedir. Sağlam kemik tarafında bulunan kondrositler

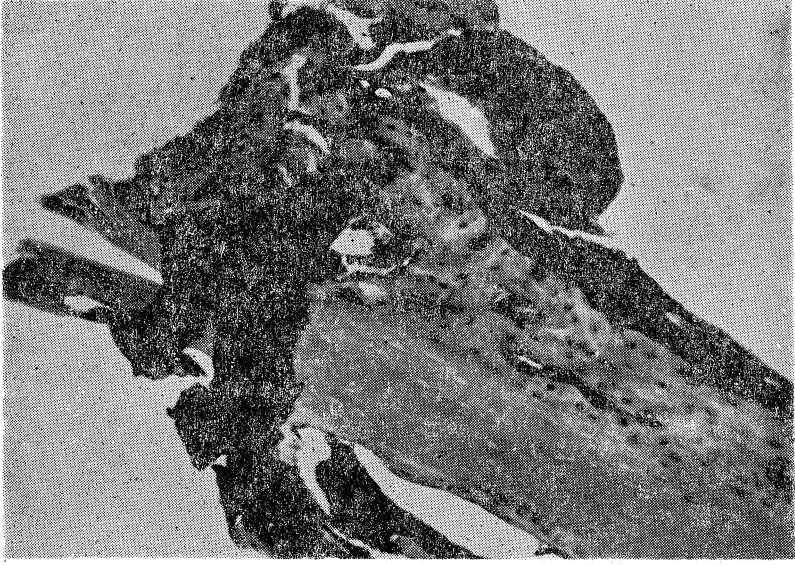
hacımca daha büyük, callus merkezine doğru kondrositlerin hacimleri azalmaktadır. İltihabi hücre infiltrasyonu hemen hiç görülmemektedir (Resim 5).



Resim 6: D₃ vitamini preparatı (H+E).

Kondroblastlar ve kondrositler sayıca az olup, az miktarda il-

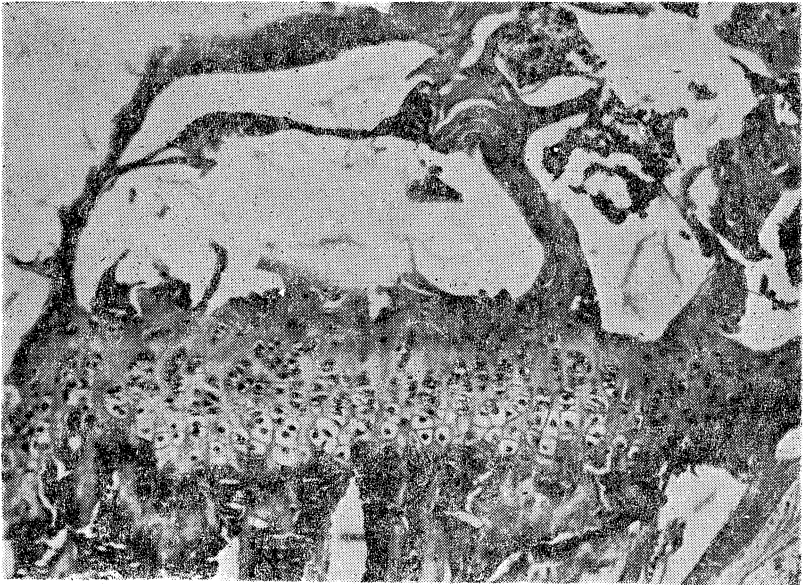
tihabi hücre infiltrasyonu görülmektedir (Resim 6).



Resim 7: Anabolizan ve D₃ vitamininin kombine verildiği varelerden hazırlanan preparat (H+E).

Callus sahasında mitotik aktivite az olup, hücre bakımından sadece anabolizan verilen gruba nazaran fakir bir durum gö-

rülmektedir. Ara madde, hücrelere nazaran daha geniş bir yer kaplamaktadır (Resim 7).

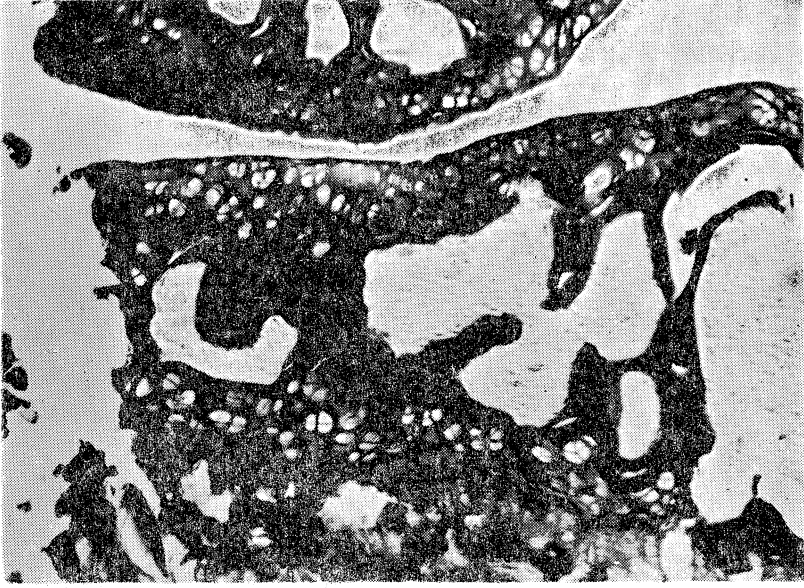


Resim 8: Kontrol grubu preparatı (H+E).

Callusu oluşturan hücrelerin çoğu kondrosit olup, bu hücrelerin çoğunun büyük oluşu dikkati

ti çekmektedir (Resim 8).

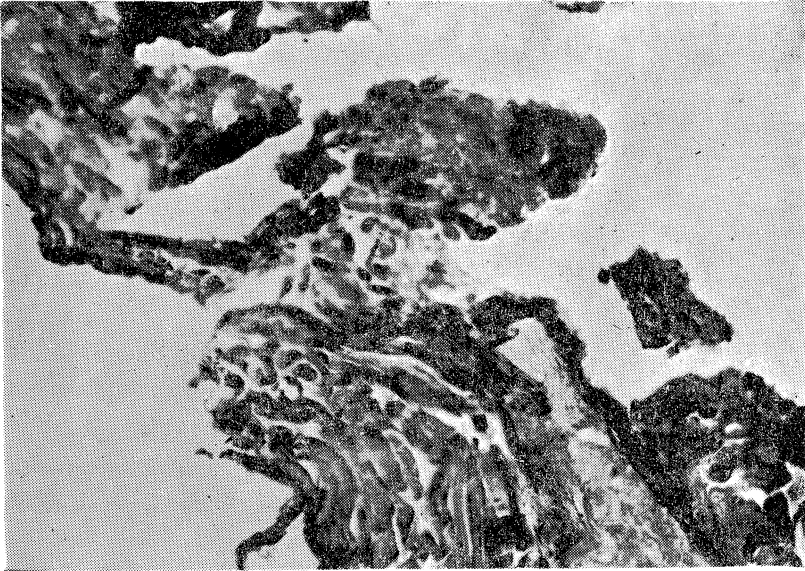
Van-Gieson boyama metodu ile hazırlanan preparatlar.



Resim 9: Sadece anabolizan verilen farenin callus sahası (Van-Gieson).

Preparatta kırık sahasında kollagen fibrilleri bakımından az bir kollagenleşme olduğu görül-

mektedir. Bu kollagenleşme kontrol grubu ile aşağı yukarı aynı derecededir (Resim 9).



Resim 10: Anabolizan + D₃ vitaminin kombine olarak verildiği fareden hazırlanan preparat (Van-Gieson).

Kırık sahasında minimal bir kollagenleşme olduğu görülmektedir (Resim 10).

Kollagen fibrillerin varlığı bakımından cüz'i bir kollagenleşme olduğu görülmektedir (Resim 11).



Resim 11: Kontrol grubu preparatı (Van-Gieson).

Kollagenleşmeyi değerlendirebilmek için Van-Gieson metodu ile yaptığımız tetkik neticelerini özet olarak ifade edersek, Anabolizan, Anabolizan + D₃ vitamini ve kontrol gruplarında kollagenleşmenin Anabolizan + C vit. grubuna nazaran (1) minimum olduğu tesbit olunmuştur.

TARTIŞMA

Sadece anabolizan verilen farelerden hazırlanan preparatlarda kondrosit sayısının kontrol grubuna nazaran aşırı bir artış göstermesi bu steroidin kollagen sentezinden ziyade kondrositik

aktivite üzerinde rolü olduğunu düşündürmektedir. Williams (6), Anabolizan olarak kullanılan testosteron derivelerinin M.R.N.A. aracılığı ile ribosomlarda sayıca bir artma ve netice itibariyle protein sentez kapasitesinde bir çoğalma meydana getirdiğini tesbit etmiştir. Bu durum pek muhtemelen kondroblast mitozunun fazlaşması şeklinde tezahür etmektedir. Zira, yalnız anabolizan verilen farelerde kollagenleşme, kontrol gruplarında olduğu kadardır. Bu durumda androjenlerin, ekstra sellüler kollagen sentezinden ziyade, intrasellüler protein yapımını arttırdığını ve netice olarak aşırı mitotik aktivitenin (kondro-

blastik aktivite) oluştuğunu ifade edecek niteliktedir.

Anabolizan ve D₃ vitamini verdiğimiz farelerden Hematoxylen-Eosin ile hazırlanan preparatlarda, mitotik aktiviteyi, sadece anabolizan verilenlere nazaran daha az bulmamız, D₃ vitamininin anabolizan aktivitesini inhibe edici bir fonksiyon yaptığını düşündürmektedir. Bu inhibisyon, gerek anabolizanların, gerekse tatbik olunan D₃ vitamininin steroid yapısında olmalarına ve muhtemelen bu iki ilaç arasında kompetatif bir inhibisyonun oluşması şeklinde izah olunabilir. Aynı farelerden kolalagen yapımını görebilmek için Van-Gieson boyama metodu ile hazırladığımız preparatlarda kollagenleşmenin yine düşük seviyede görülmesi anabolizanların, D₃ vitamini ile olan kombinasyonlarının kollagen sentezi üzerinde pozitif rolü olmadığını düşündürmektedir. Dikshit'e göre (3) D₃ vitamini muhtemelen sitrat sentezi üzerinde rol oynar. Neuman (2) D₃ vitamininin coenzim rolü oynadığını bu coenzim faaliyetinin kollagen sentezi ile bir ilişkisinin bulunmadığını ifade etmektedirler. D₃ vitamini fazla miktarda alındığında kemik organik matriksinden ziyade, mineral kısmını etkiler ve paratiroid hormonu ile aynı paralelde fonksiyon görür. Bu görüşlere ilave olarak Rasmussen'in (5) araştırmalarında fizyolojik limitlerin altında alınan D₃ vitamini vak'alarında osteoblast, osteoklast hücrelerinde ve osteoid do-

kuda herhangi bir değişiklik görülmediği, yalnız D₃ vitamini fazla vak'alarda sadece epifiz plağında bir kalınlaşma olduğu, bu durumun da mineralizasyon olayındaki gecikmeye bağlı bulunduğu tesbit olunmuştur.

Araştırmamızda farelere vermiş olduğumuz D₃ vitamini yüksek dozda olmayıp, optimal doza göre ayarlanmıştır. Bu neden ile tatbik etmiş olduğumuz D₃ vitamininin kemiklerden herhangi bir şekilde Ca++ çözmesi bahis konusu edilemez. Ayrıca muhtemelen tatbik etmiş olduğumuz D₃ vitamini farelerin gıdaları ile almış olduğu kalsiyumun, bağırsaklarda daha iyi bir şekilde absorbe edilmesinde rol oynamış olabilir. D₃ vitamininin bu absorbsiyondaki rolünün yanı sıra lysin ve arginin gibi amino asitler de kalsiyumun bağırsaklardan rezorbsiyonuna yardımcı olurlar (4). Öte yandan Hyerquist (7) ve arkadaşları tarafından, farelerde D₃ vitamini eksikliği ve genç farelerde D₃ vitamini eksikliği esnasında cortical diaphyseal kemiğin kimyasal terkininin farklılığı da belirtilmiştir.

Memeli hayvanlarda plazma kalsiyum seviyesi yaklaşık olarak % 9-11 mg' dir. Bu kalsiyumun 5-6 mg'ı Ca++ şeklinde, geri kalan kısmı ise, plazma proteinlerine bağlı olarak bulunur. Pek muhtemeldir ki, D₃ vitamini tatbik etmiş olduğumuz farelerde bu vitaminin bağırsaklardaki kalsiyumun absorbsiyonunu artırmasına bağlı olarak plazma

kalsiyum seviyesi yukarıda belirttiğimiz seviyenin üstüne çıkmış olabilir. Bu durumda plazma fosfat seviyesinde bir düşme meydana gelebilir. Yaptığımız literatür taramalarında; bu konu ile ilgili bir araştırmaya rastlamadık. Ancak, kandaki kalsiyum ve fosfat dengesi bu maddelerden birinin çoğalması halinde; diğerrinin azalması şeklinde tezahür ettiğinden, böyle bir durum olabileceği düşünülebilir.

Yalnız D₃ vitamini tatbik etmiş olduğumuz farelerden Hema-toxylen - Eosin ile hazırlanan pre-paratlarda, kondroblast ve kondro-sitler sayıca az olup, hücreler arası maddenin fazlaca olduğu tes-bit olunmuştur. Bu durumda D₃ vitamininin, hücressel aktivite ve kollagen sentezi üzerinde rolü olmadığını doğrulamaktadır.

Kontrol grubumuzda hücre-sel yapı olarak kondrositleri gör-memiz, normal sayılabilecek bir ara madde bulunması ve kollagen bakımından fakir bir yapıt gör-memiz, karakteristiktir.

Şayet teşekkül eden kallusta bir mineralizasyon hadisesi var idiyse, bu durum histo - şimik me-todlardan ziyade, X - ray difrak-siyonu metodu ile gösterilebilir. Elimizdeki teknik imkanlar X - ray kristal ografisine müsait olmadı-ğından, kalsiyum tuzlarının, teşek-kül eden kallus organik matriksi üzerinde, primer kallus devresin-de, kallusun yapısına girip girme-diği araştırılabilir. Ancak bu hu-sus, bir başka araştırma ile orta-ya konabilir.

Yukarıda tartıştığımız husus-ları netice olarak özetlersek:

1 — Sadece anbolizan veri-len farelerde kondrosit sayısının büyük ölçüde arttığını ve kondro-dit proliferasyonunun bazı yerler-de muntazam, bazı yerlerde ise gayri muntazam hücre yığınları şeklinde değiştiği ve buna karşı-lık kırık parçalarının birbirlerine bağlanması açısından makrosko-pik olarak kırık parçalarının muntazam biçimde birleştiği tes-bit olunmuştur. Fibröz band, yal-nız anabolizan verilen farelerde zayıf bir şekilde teşekkül etmiştir.

2 — Kontrol grubunda, Ana-bolizan verilen farelere nazaran daha az kondroblastik aktivite bu-lunduğu, bunun yanı sıra olduk-ça iyi bir fibröz band teşekkülü görülmüştür.

3 — Anabolizan ve D₃ vita-mini tatbik olunan farelerde bu iki steroidin kompetitif inhibisyon gösterdiği, bu durumu da mitotik aktiviteyi inhibe ettiği görülmüş-tür.

SUMMARY

Effect of Androgen Steroids (Anabolizan) and vitamin D in primary callus formation.

The effect of androgen ste-roids (Primobolon depot of Sche-ring comp.) and vitamin D₃ on the primer callus formation have been evaluated Separately and in combinations, Androgen steroid

seems to have a positive effect in terms of chondroblastic activity.

The chondroblastic activity observed in primary calus period in the animals which treated with vitamin D₃ alone, seems to have less activity in comparison to anabolism applied animals.

Chondroblastic activity seems to be least in comparison control group and the other two groups.

Primary callus formation in animals which androgen steroid and vitamin D₃ applied together showed marked decrease in chondroblastic activity, it is conceivable that androgens and vitamin D when applied in combination, seem to inhibit their required activities.

Evaluations in terms of fibrous band formation indicate that in groups fibrous band formation seems to be less than anabolism and C vit applied group.

KAYNAKLAR

- 1 — OKTAY, C., KAYA, Ö. : Anabolizm ve C vitamini primer callus devresindeki etkisinin in vitro olarak tetkiki, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi Cilt 8, Sayfa 3, 1975.
- 2 — Neuman, W.F., C.M. : Possible fundamental action of pa-

rathyroid hormone in bone. In R.O. Greep and R.V. Talmage (eds) : The Parathyroid Glands. Springfield, Illinois, Charles C. Thomas, 1961 : pp. 310 - 326.

- 3 — Dikshit, P.K., Joshi, J.G. Patwardhan, V.N. : Mode of action of vitamin D. The influence of vitamin D on the citric acid content and citrogenase activity of rachitic epiphyseal cartilage of albino rat, Indian J. Med. Res. 44 : 719 - 725, 1956.
- 4 — White, A., Handler, P., Smith, E.L. : Principles of Biochemistry, fourth Edition, New York McGraw - Hill Book Company, 44 : 937 - 953. 1968.
- 5 — Rasmussen, P., The action of vitamin D deficiency on bone tissue and the epiphyseal plate in rats given adequate amounts of calcium and phosphorus in the diet, Arch. Oral Biol. 14 : 1293 - 1304, 1969.
- 6 — Williams, R.H. : Textbook Endocrinology W.B. Saunders Company, London, 849 - 903, 1962.
- 7 — Hjertquist, S.O., Berquist, E., Sevastikoglou, J.A., Chemical studies of cortical diaphyseal bone during vitamin D deficiency in the rat. Acta orthop. Scand Suppl. 136, 1970.