

# Otoklavizasyon ve dondurma işlemlerinin tavşan kemik dokusunda oluşturduğu değişiklikler

Erol Yalnız (1), Şeref Aktaş (2), Gülara Hüseyinova (3), Ramazan Kayapınar (4)

10 adet erişkin tavşanın her iki femur distalleri rezeke edilerek yumuşak dokularından temizlendi. Sağ femurlar -80 derecede 3 hafta tutuldu. Sol femurlar ise 120 derecede 20 dakika süre ile otoklavize edildi. Her iki gruptaki kemikler ışık ve elektron mikroskobu ile incelendi. Dondurulmuş kemiğin hücresel elemanlarını ve yapısını kısmen koruduğu, buna karşılık, otoklavizasyonun kemikte destrüktif ve dejeneratif değişiklikler yaptığı ışık ve elektron mikroskobu ile gösterildi.

**Anahtar Kelimeler:** Kemik grefti, otoklavizasyon, dondurma, allogreft

## The effects of autoclaving and freezing on the rabbit bone.

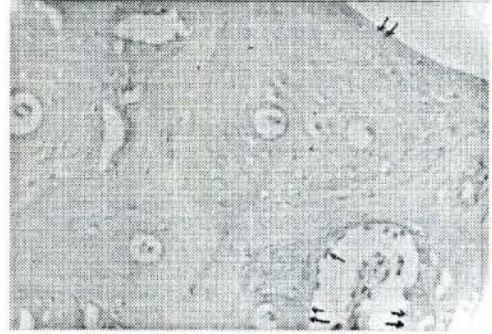
After resection of both distal femurs of ten rabbits, bones were dissected from soft tissues. Right femurs were frozen at -80° C for three weeks. Left femurs were autoclaved at 120° C for 20 minutes. The bones of both groups were examined by light and electron microscope. The histological and electron microscopic examination of the frozen bone revealed that cellular elements and structure were mainly preserved. Destructive and degenerative changes in cellular elements and structure of bone were demonstrated by light and electron microscope after autoclaving.

**Keywords:** Bone graft, autoclaving, freezing, allogreft

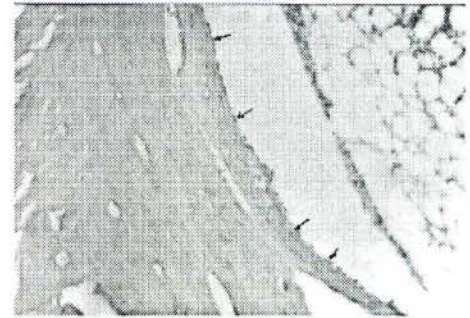
Son yıllarda tümör cerrahisinde, amputasyonların yerini giderek lokal rezeksiyonlar almaktadır. Bu ameliyatlardan sonra kemik yapının rekonstrüksiyonu ciddi bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Protez uygulamaları, masif allogreftler ya da rezeke edilen kemiğin otoklavize edildikten sonra reimplantasyonu başlıca kullanılan yöntemlerdir (1, 4, 8, 10, 13, 21). Allojenik kemik greftlerinin kullanılması, komplike ve pahalı bir yöntemdir. Kemiğin otoklavizasyonu ise daha basit bir işlem olarak birçok avantaja sahip gibi görünmektedir (8, 11, 14, 15, 20, 22,). Bu çalışmada otoklavizasyon ve dondurma işlemlerinin tavşan kemiğinde meydana getirdiği değişiklikler ışık ve elektron mikroskobu ile değerlendirildi.

## Gereç ve yöntem

10 adet ortalama 2.3 kg ağırlığında erişkin ada tavşanının 20 femur kemiği araştırmanın gereğini oluşturdu. Tavşanlar intrakardiyak ketamin hidroklorür ile öldürüldükten sonra her iki femur kemikleri çıkarılarak adale, ligaman ve periostları temizlendi. Sağ femurlar -80 derecede 3 hafta tutuldu. Sol femurlar 120 derecede 20 dakika süre ile otoklavize edildi. Tüm femurlardan ışık ve elektron mikroskopisi için örnekler alındı. Örnekler formaldehid solusyonunda fikse edildikten sonra %10 luk formik asit ile dekalsifiye edildi. Işık mikroskopisi için alınan örnekler Hematoxylene-Eosin ile boyandı. Elektron mikroskopisi için alınan örnekler önce %2.5 fosfat tamponlu gluteraldehid ve takiben tamponlu %1'lik osmium tetroksit ile fikse edildi. Dehidratasyonu takiben Epon 812 ile bloklandı. Kesitler üranil-asetat ve Reynold'un kurşun boyası ile kontrastlandırıldıktan sonra JEM 100 B elektron mikroskobu ile incelendi.



Resim 1: Dondurulmuş kemiğin histolojik görünümü: Osteositler, osteoklastlar ve kemik lamellerinin konsantrik yapısı korunmaktadır. Osteoblastların bulunduğu alanlar tek ok işareti ile, inaktif bölgeler çift ok işareti ile gösterilmiştir (H.E. X200)



Resim 2: Dondurulmuş kemiğin histolojik görünümü: Osteoblastların aktivitelediği alanlar tek ok ile gösterilmiştir (H.E. X 400)

## Sonuçlar

Dondurulmuş kemiklerin histolojik incelenmesinde kemik hücrelerinde ve stromada minimal değişik-

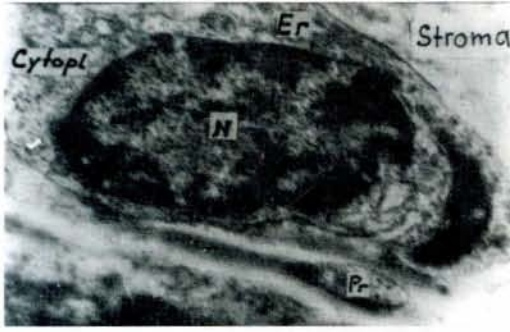
(1) Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Yard. Doç. Dr.

(2) Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi

(3) Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Uzman Dr.

(4) Trakya Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Yüksekokulu, Yard. Doç. Dr.

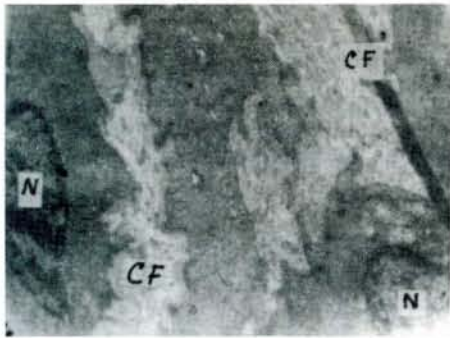




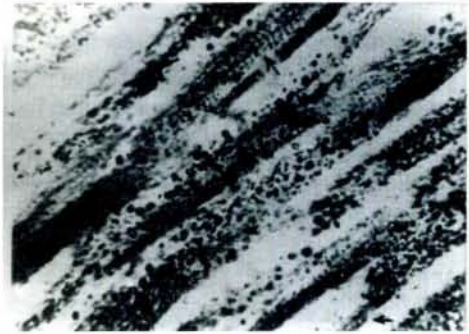
Resim 3: Dondurulmuş kemiğin elektron mikroskopik görünümü: Büyük çekirdekli, kaba kromatinli, sitoplazması berrak osteosit ve çevresindeki stromal elemanlar (N: Çekirdek, Er: Endoplazmik retikulum, Pr: Osteositin çıkıntısı) (X 15000)



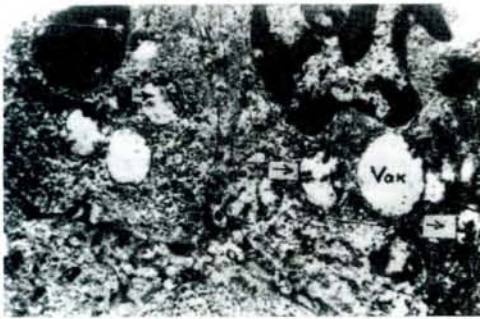
Resim 6: Dondurulmuş kemiğin elektronik mikroskopik görünümü: Kollajen liflerin transvers ve longitudinal görünümü (Ok işareti: Kalsifikasyonun erken evresi) ( X 12000)



Resim 4: Dondurulmuş kemiğin elektron mikroskopik görünümü: Osteoblastların sitoplazması yoğunlaşmış bir bazofilik, çekirdekleri eksantrik yerleşimde görülmektedir (N: Çekirdek, CF: Kollajen lifler) ( X 6000)



Resim 7: Dondurulmuş kemiğin elektron mikroskopik görünümü: Stromal kollajen liflerinin periodik çizgili görünümü ve hidroksiapatit kristallerin düzenli dağılımı ( X 70000)



Resim 5: Dondurulmuş kemiğin elektron mikroskopik görünümü: Osteoklast dış membranlarının düzensizliği, sitoplazmada hidroksiapatit kristalleri içeren vakuoller görülmektedir (Vak: Vakuoller, Ok işareti: Hidroksiapatit kristalleri) ( X 15000)

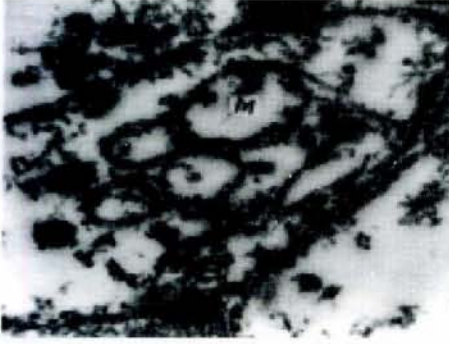


Resim 8: Otoklavize kemiğin histolojik görünümü: Derin destrüktif ve dejeneratif irreversible değişiklikler: Hücrelerin vakuolizasyonu, çekirdeklerin kaybı ve kemik lamellerinin konsantrik şeklinin bozulması görülmektedir (H.E. X 100).

likler gözlemlendi. Haversian sistemin ve kemik trabeküllerinin periferik bölümlerinde osteoblastların korunduğu görüldü (Resim 1, 2). Kemik matriksinde haversian kanallarının etrafında kemik lamelleri konsantrik yapıda olmakla beraber bazı alanlarda lamellerin bu yapısı bozulmuştu. Dondurulmuş kemiğin elektron mikroskopik incelemesinde osteositlerin korunduğu gözlemlendi. Hücreler oval ve büyük çekirdekliydi. Çekirdekler kaba kromatinli ve sitoplazmaları berraklaşmış olup az miktarda mitokondri, endoplazmik retikulum ve diğer organoidleri içermekteydi (Resim 3). Osteoblastların sitoplazması bazofilik olarak izlendi. Çekir-

dekler açık renkli olup eksantrik yerleşmişti. Hücrelerin etrafında kollajen lifler tespit edildi. Osteoblastların sitoplazmalarında ribozom, endoplazmik retikulum, mitokondri ve diğer organellerin normale oranla azaldıkları görüldü (Resim 4). Osteoklastların dış membranları düzensizdi. Sitoplazma içinde hidroksiapatit kristalleri içeren vakuoller görüldü (Resim 5). Hücrelerin stoplazmasında bazofilik küçük granüller izlendi. Çekirdekleri düzensiz kaba kromatinler içermekteydi. Stroma kesitlere göre transvers ve longitudinal dizilim gösteren kollajen liflerden oluşmuştu (Resim 6). Kollajen liflerin periodik çizgileri korunmaktaydı. Periodik çizgili fibrillerle hidroksiapatit kristallerin bir düzen oluşturduğu ve aralarındaki bu düzenin korunduğu gözlemlendi (Resim 7).





Resim 9: Otoklavize kemiğin elektron mikroskopik görünümü: Kemik hücrelerde destrüktif ve dejeneratif değişiklikler görülmektedir. Hücrelerin dış membranları korunmakla beraber, çekirdekleri kayba uğramış, sitoplazması berraklaşmış, mitokondrileri (M) genişlemiş ve matriksleri berraklaşmış, kristalleri kayba uğramış olarak görülmektedir ( X 20000)

Otoklavize edilmiş kemiklerde hücre elementlerinde ve stromada çok belirgin destrüktif ve dejeneratif değişiklikler tespit edildi. Tüm preparatlarda osteositler, osteoblastlar ve osteoklastlar büyük berrak boşluklar şeklindeydi ve çoğunda çekirdekler kaybolmuştu (Resim 8). Kemiğin konsantrik lameller yapısı bozulmuştu. Otoklavize kemiğin elektron mikroskopik incelenmesinde hücrelerin büyük kısmında çekirdeklerin kaybolduğu gözlemlendi. Bazı hücrelerde iki konturlu hücre membranları korunmasına rağmen sitoplazmalarında irreversibl değişiklikleri ifade eden destrüktif ve dejeneratif hücre organelleri gözlemlendi. Mitokondrilerin dejeneratif formları, membranla çevrili, büyük, şişmiş vakuoller şeklindeydi. Matriksi ve kristalleri kaybolmuştu (Resim 9). Stromanın kollajen lifleri destrüktif olmuş, periodik çizgileri kaybolmuştu. Dejeneratif olmuş kollajen liflerin arasında hidroksiapatit kristalleri düzensiz ve dağınık şekilde yerleştiği görüldü. Hidroksiapatit kristallerin, kollajen liflerle olan düzenli ilişkisi bozulmuştu (Resim 10).

## Tartışma

Son yıllarda kemik ve yumuşak doku tümörlerinin tedavisinde büyük ilerlemeler görülmektedir. Tümör cerrahisinde yapılan geniş lokal rezeksiyonlardan sonra iskelet yapının rekonstrüksiyonu ciddi bir problemdir. Phemister (16) 1939 da tümörün blok olarak çıkarılıp otojen greftler ile artrodez yapılmasını önermiştir. O tarihten sonra Wilson ve Lance (24), Campanacci ve Costa (3), Enneking ve ark. (5), benzer teknikler kullanarak başarılı sonuçlar yayınlamışlardır. Ancak bu yöntemde artrodezin sağlanması uzun süreli immobilizasyon gerektirmekte ve artrodezin yanısıra komşu eklem hareketlerinde de kısıtlılıklar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca otojen greft kullanımının, ek bir insizyon gerektirmesi, donör kemikte zayıflamaya neden olması ve enfeksiyon riskini artırması gibi dezavantajları vardır. Hem hareketli bir eklem elde etmek, hem de defektin rekonstrüksiyonu sağlamak kitlesel osteokondral greftler yada özel imal edilmiş protezler ile mümkün olmaktadır. Allojenik kemik greftleri, kemik bankasının yüksek maliyeti, uygun ölçüde greftin her zaman bulunamaması ve rejeksiyon gibi



Resim 10: Otoklavize kemiğin elektron mikroskopik görünümü: Stromal kollajen liflerin destrüktif ve dejeneratif görünümü: Periodik çizgileri kaybolmuş, hidroksiapatit kristalleri düzensiz ve dağınık yerleşim göstermektedir ( X 62000)

sorunlara sahiptir. Rezeke edilen tümürlü kemiğin otoklavize edilerek tümör hücrelerinin devitalizasyonunu takiben reimplantasyonu ise osteokondral kitlesel allojenik greftlere bir alternatiftir (2, 11, 12, 13, 20, 25, 26).

Osawa ve arkadaşları (18), 1990 yılında yaptıkları çalışmada dondurulmuş kemiğin normal kemiğe benzer mikroskopik özellikler içerdiğini, haversian sistemlerin ve damarların korunduğunu ve osteositlerin belli oranda mevcut olmasına rağmen otoklavize kemikte osteositlerin destrüktif olduklarını belirtmişlerdir.

Kemik morfogenetik protein (B.M.P.) kemik dokusu tahrip olduğunda ortaya çıkan, diş dokusu matriksinde de yer alan bir glikoproteindir. Pluripotansiyel mezankimal hücreleri uyararak yeni kemik dokusu oluşumuna neden olur (9). Osteoindüksiyon kemotaksi, mitoz ve diferansiyasyon aşamaları ile gerçekleşmektedir (19). Dondurma işleminde B.M.P. korunmakta ve bunun sonucunda da allojenik kemik greftleri osteoindüktif aktivitelerini sürdürmektedir (6, 13, 17, 18). Otoklavizasyonda ise kemiğin tüm proteinleri ile beraber B.M.P. inde denatüre olduğu ve bunda greftin osteojenik ve osteoindüktif özelliklerini yok ettiği bildirilmiştir (6, 17, 23). Nakanishi ve ark. (17) 70 derecenin üzerindeki ısılarda B.M.P. nin tahrip olduğunu göstermişlerdir.

Köhler ve ark. (11) yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada hem otoklavize otojenik, hemde dondurulmuş allojenik kemiklerin zayıf bir osteoindüktif aktiviteye sahip olduklarını, bu iki tip greft arasındaki farkın mineral içeriklerinde olduğunu ve allogreftlerin otoklavize greftlere oranla daha fazla mineral içerdiğini bildirmişlerdir. Guo ve ark. (7) ise total demineralizasyonun osteoindüktif aktiviteyi yok ettiğini ancak %23-40' lük demineralizasyon uygulandığında greftin bu özelliğini koruyabildiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada, dondurma ve otoklavizasyon işlemlerinin kemik dokusu üzerinde yaptıkları değişiklikler ışık ve elektron mikroskopisi ile gösterildi. Dondurulmuş kemiğin normal kemiğe daha yakın özellikler içerdiği, otoklavize kemiğin ise temin ve kullanımı teknik açıdan kolay olmakla beraber, otoklavizasyonun kemikte ileri derecede destrüksiyon yaptığı saptandı.



## Kaynaklar

- Alpaslan, A. M.: Kötü huylu kas iskelet tümörleri (Tanı, evreleme ve tedavi prensipleri). Hacettepe Ortop. Derg. 1: 38-47, 1991.
- Bonfiglio, M., and Jeter, W. S.: Immunological responses to bone. Clin Orthop. 172: 277-280, 1972.
- Campanacci, M., and Costa, P.: Total resection of distal femur or proximal tibia for bone tumors. J. Bone Joint Surg. 61 B: 455-462, 1979.
- Campanacci, M.: Introduction. In Bone and Soft Tissue Tumors, edited by Campanacci, M. pp 38-90, New York, Springer-Verlag, 1986
- Enneking, W. S., and Shirley, P. D.: Resection arthrodesis for malignant and potentially malignant lesions about the knee using an intermedullary rod and local bone grafts. J. Bone Joint Surg. 59 A: 223-230, 1979.
- Goldberg, V.M., Stevenson, S.: Bone transplantation. In: Surgery of the Musculoskeletal Surgery. Edited by Evaris, C. M. Ed. 2, Vol. 1: 115-149, New York, Churchill Livingstone, 1990.
- Guo, M.Z., Xia, Z.S., Lin, L.B.: The mechanical and biological properties of demineralised cortical bone allografts in animals. J. Bone Joint Surg. 73-B: 791-794, 1991.
- Johnston, J.O., Harries, T.J., Alexander, C.E., Alexander, A.H.: Limb salvage procedure for neoplasms about the knee by spherocentric total knee arthroplasty and autogenous autoclaved bone grafting. Clin. Orthop. 181:137-145, 1983.
- Kıral, A., Şariak, Ö., Gür, E., Gültekin, N.: Tavşanlarda uzun kemiklerdeki geniş segmental defektlerin iyileşmesinin allojenik demineralize kemik matriksi ve otojen kemik iliği transplantasyonu ile uyarılması. Acta. Orthop. Traum. Turc. 24:97-103, 1990.
- Koskinen, E. V., Salenius, P., Alho, A.: Allogeneic transplantation in low-grade malignant bone tumors. A new operative technique to avoid amputation. Acta Orthop. Scan. 50:129-138, 1979.
- Köhler, P., Glas, J. E., Larsson, S., Kreicberg, A.: Incorporation of nonviable bone grafts. Autoclaved autogeneic and frozen allogeneic bone grafts compared in the rabbit. Acta Orthop. Scan. 58: 54-60, 1987.
- Köhler, P., Kreicberg, A.: Incorporation of autoclaved autogeneic bone supplemented with allogeneic demineralized bone matrix. An experimental study in the rabbit. Clin. Orthop. 218:247-258, 1987.
- Köhler, P., Kreicberg, A.: Chondrosarcoma treated by reimplantation of resected bone after autoclaving and supplementation with allogeneic bone matrix. A case report. Clin. Orthop. 294: 281-284, 1993.
- Kreicbergs, A., Köhler, P.: Diaphyseal reconstruction by autoclave bone (Reimplantation experiments in rabbits). Acta Orthop. Scan. 58: 61-65, 1987.
- Lauritzen, C., Alberius, Santanelli, F., Vallfors, B., Lijja, J., Stephensen, H.: Repositioning of craniofacial tumours bone after autoclaving. Scan. J. Plast. Reconstr. 25: 161-165, 1991.
- Le Vay, D: The history of orthopaedics. An account of the study and practice of orthopaedics from the earliest times to the modern era. The Partheron Publishing Group Ltd. England. 444, 1990.
- Nakanishi, K., Sato, K., Sato, T., Takahashi, M., Fukaya, N., Miura, T.: Preservation of bone morphogenetic protein in heat-treated bone. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 66(9): 949-955, 1992.
- Osawa, M., Hara, H., Ichinose, Y., Koyama, T., Kobayashi, Sh., and Sugita, Y.: Cranioplasty with a frozen and autoclaved bone flap. Acta Neurochir. 102: 38-41, 1990.
- Reddi, A.H., Wientroub, S., Muthukumaran, N.: Biologic principles of bone induction. Orthop. Clin. North Am. 18:207-212, 1987.
- Rosenberg, A. G., and Mankin, H. J.: Complications of Allograft Surgery, In Complications in Orthopaedic Surgery, edited by Epps, C. H. Jr. Ed. 2, Vol: 2 pp 1385-1417, Philadelphia, J. B. Lippincott Company, 1986.
- Sijbrani, S.: Resection and reconstruction for bone tumors. Acta Orthop. Scan. 174:15-23, 1983.
- Smith, W. S.: Struhl, S., Arbor, A.: Replantation of an autoclaved autogenous segment of bone treatment. J. Bone Joint Surg. 70A:70-75, 1988.
- Urist, M.R., Strates, B.S.: Bone morphogenetic protein. J. Dent. Res. 50: 1392-1406, 1971.
- Wilson, P. D., and Lance, E.: Surgical reconstruction of the skeleton following segmental resection for bone tumors. J. Bone Joint Surg. 47 A: 1629-1635, 1965.
- Yablon, I. G., Cooperband, S., and Covall, D.: Matrix antigens in allografts. The humoral response. Clin. Orthop. 168: 243-251, 1982.
- Yablon, I. G., Cooperband, S., and Covall, D.: Matrix antigens in allografts. The cell mediated response. Clin. Orthop. 172: 277-280, 1983.

### Yazışma Adresi:

Yard. Doç. Dr. Erol Yalnız

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

22030 Edirne, Türkiye