

Otogreftli ve greftsiz kırık iyileşmesinin ışık ve elektron mikroskopla histopatolojik değerlendirilmesi

Faik Altıntaş⁽¹⁾ Hüseyin Bayram⁽²⁾, Mehmet Kaya⁽³⁾, Gürbüz Baytok⁽⁴⁾, Nurdan Tunalı⁽⁵⁾

Tavşan fibulalarında deneysel kırık oluşturularak, otogreftli ve greftsiz kırık iyileşmesinin, ışık ve elektron mikroskop ile histopatolojik değerlendirilmesi yapıldı. Işık mikroskop ile yapılan değerlendirmede otogreft uygulanan grup ile greftsiz grubun kırık iyileşme süreleri arasında belirgin farklılık bulunmadığı görüldü.

Elektron mikroskopla yapılan değerlendirmede ise, başlangıçta kondroblastların bol miktarda koyu boyanmış mitokondriyon ve granüler endoplazmik retikulum kapsadığı, daha sonra mitokondriyonların renklerinin açıldığı, kondrositlerden matris içine etrafı koyu renkli sitoplazmik çıkıntılar oluştuğu, matriste bu çıkıntılar içerisinde ve dışında hidroksiapatit kristalleri oluştuğu ve hücrelerin giderek piknotikleştiği görüldü. Bu bulgular, mitokondriyonların kalsiyum taşınmasında rolü olduğu⁽³⁾ ve hücre zarı etrafındaki alkalen fosfataz enziminin kalsiyumun kristallesmesini sağladığı⁽⁴⁾ görüşlerini desteklediği şeklinde yorumlandı.

Histopathological Evaluation of the Fracture Healing With and Without Bone Grafts by Light and Electron Microscope

The effects of autologous bone grafts on the fracture healing were studied by light and electron microscope. This study was carried out in the rabbits which was divided two group. One group was to heal with autologous bone grafts and control group without graft. There was no difference between healing time of both groups.

An evaluation under electron microscope revealed that chondroblasts has had coupus dark stained mitochondria and granulare endoplasmic reticulum in the early phase, as the time pass the color of mitochondria became light color. There was some cytoplasmic process with dark stained margine from chondrocytes to matrix. In the matrix crystals of hydroxyapatit were acummulated in and around of this process. At the late phase cells became picnotic.

This findings were interpreted as mitochondria had some task in the calcium transportation and calcium is crystalised by the alkaline phosphatase activity around the cell wall.

Kırık kaynaması vücudun diğer dokularında görülen tamir olaylarına göre farklı olup kırık sonrası aslına yakın iyileşme görülür². Bazen çeşitli nedenlerle kırık kaynaması yavaşlar veya durabilir. Normalde kendiliğinden olan bu tamir olayında yavaşlayan kaynamayı hızlandırmak veya duran kaynamayı yeniden uyararak kaynamayı sağlamak için kemik nakli ameliyatları uygulanır^{4,6,9,11,13}.

Sıklıkla kullanılan greftler ise otogreftlerdir. Kemik greftlerin osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon görevleri vardır¹³. Yapılan çalışmalarla kırık kaynamasının tüm safhaları, greftlerin özellikleri ve davranış şekilleri ortaya konulmuş, kemik morfogenetik proteini adı verilen nonkollagenik proteinin osteoindüksiyon yaptığı gösterilmiştir^{5,9,13}. Son yıllarda elektron mikroskopla yapılan çalışmalarla kemik hücrelerinin ultrastrüktürel durumları incelenmiş, mitokondriyonların kalsiyum taşınmasında rol aldığı, alkalen fosfatazın ise hidroksi apatit kristallerinin oluşmasını sağladığı ortaya konulmuştur^{3,14}. Çalışmamızda otogreftli ve

greftsiz kırık iyileşmesinin karşılaştırılması olarak ışık ve elektron mikroskopları düzeyinde incelenmesi yapılmış ve bulgularımız literatürle karşılaştırılmıştır.

Materyal Metod:

Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi araştırma laboratuvarında 25 adet 2-2,5 kg ağırlığında, erişkin erkek tavşan kullanıldı. Tavşan fibulası rudimantar olup 1/3 orta bölgeden tibiaya kaynamış durumdadır ve yük alan bir kemik değildir. Bundan dolayı kırık sonrası herhangi bir tespate gerek göstermediği için çalışma fibula üzerinde yapıldı. Tavşanlar 40 mg/kg nembutal İ.M. verilerek uyutuldu. Steril şartlar altında önce sağ krista iliaka üzerinden yapılan insizyonla kemik grefti alındı. Spongioz greft ayrılarak steril olarak bekletildi. Sonra sağ fibula üzerinden yapılan insizyonla fibula açığa çıkartıldı. Sivri uçlu makas ile kesilerek kırık oluşturuldu. Otogreft ile greftlenerek tabakalar kapatıldı. Daha sonra sol fibula da makas ile kesilerek kırık oluş-

(1) SSK Göztepe Hastanesi. Ortopedi ve Travmatoloji Uzmanı

(2) Ç.Ü.Tıp Fakültesi. Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı. Yard. Doç. Dr.

(3) Ç.Ü.Tıp Fakültesi. Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı. Doç. Dr.

(4) Ç.Ü.Tıp Fakültesi. Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı. Prof. Dr.

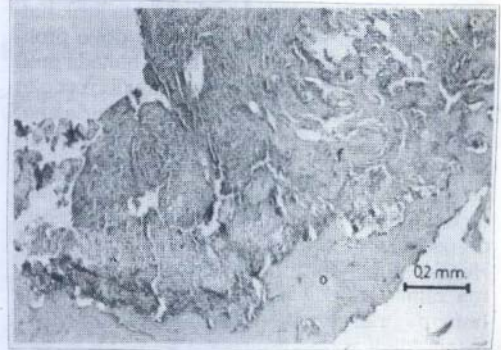
(5) Ç.Ü.Tıp Fakültesi. Patoloji Anabilim Dalı. Yard. Doç. Dr.



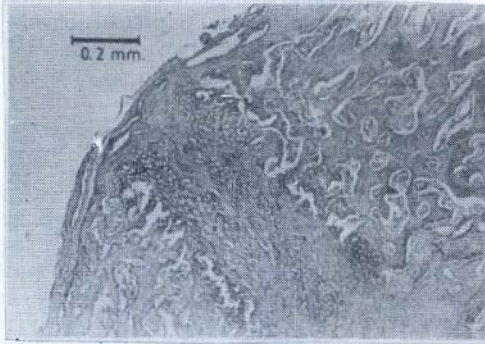
Resim 1: Greftsiz gruptan bir tavşanın 2 ve 4. haftalar sonunda ön-arka tibia-fibula grafileri



Resim 2: Ototreftli gruptan bir tavşanın 2 ve 4. haftalar sonunda ön-arka tibia-fibula grafileri



Resim 3: Greftsiz grupta 1. hafta sonunda kırık hattının mikroskopik görünümü. (O: Osseöz doku, f: fibröz doku)



Resim 4: Ototreftli grupta 3. hafta sonunda kırık bölgesinin ışık mikroskopunda görünümü. (Osseo kondral birleşme)

turuldu. Ototreft ile greftlenerek tabakalar kapatıldı. Daha sonra sol fibula da makasla kesilerek greft konulmadan tabakalar kapatıldı. Haftalık radyografiler çekilerek kırık iyileşmesi izlendi. 1., 2., 3., 4. ve 6. haftalarda her hafta 5 tavşanın aynı şekilde anestezi altında her iki fibulaları tam olarak çıkartıldı. Işık mikroskopu ile inceleme için alınan örnekler %10 luk formol içerisinde 24 saat bırakıldıktan sonra yumuşayınca kadar %10 luk nitrik asitte dekalsifiye edildi. Sonra parafin bloklar hazırlanıp 5-6 mikronluk kesitler alınarak Hematoksilen Eosin ve Van Gieson ile boyandı. Kaynamanın histolojik değerlendirilmesi, Bos ve arkadaşları¹ ile Nilsson

ve arkadaşlarının⁸ kullandığı aşağıdaki kriterlere göre yapıldı.

Kaynama şekli	Puan
Kaynama yok	0
Fibröz kaynama	1
Fibro-kartilajinöz kaynama	2
Osseo kondral kaynama	3
Osseöz kaynama	4
Trabeküler yapı oluşumu	5

Elektron mikroskop ile inceleme için kırık hattından alınan küçük parçalar hemen 7,4 pH da Millonig⁷ in fosfat tamponu ile hazırlanmış %5 lik glutaraldehit içerisinde alınıp 3 saat bekletildiler. Daha sonra %1 lik OsO₄ içerisinde 2 saat post-fikse edildi. Sonratetanol içerisinde dehidrate edilip araldit içerisinde gömüldü. Elde edilen bloklardan Reichert OM-U3 ultramikrotomu ile 200-500 A° kalınlığında kesitler alınıp, uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandı. Zeiss E.M. 10B elektron mikroskopu ile incelendi.

Bulgular

Radyolojik olarak her iki grupta da I. haftada kırık hattının belirgin olduğu, 2. haftada kal teşekkülünün başladığı, 3. haftada kal köprüleşmesinin başlayıp, 4. haftada tamamlandığı, 6. haftada ise radyolojik kaynamanın tamamlandığı görüldü (Resim 1-2).

Hastalar	Greftsiz Kırık sayısı	Grup Toplam puan	Ototreftli Kırık sayısı	Grup Toplam puan
1. hafta	5	5	5	5
2. hafta	5	10	5	11
3. hafta	5	15	5	15
4. hafta	5	20	5	20
5. hafta	5	24	5	25
TOPLAM	25	74	25	76

TABLO 1: Gruplardaki kırık kaynamasının hastalara göre dağılımı

Işık mikroskobu düzeyinde değerlendirilmedi:

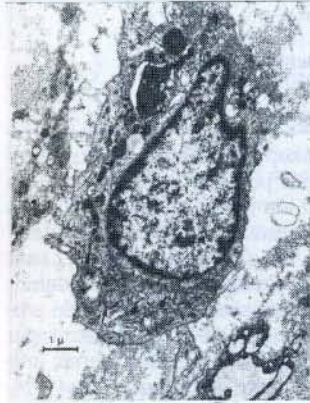
Birinci hafta sonunda her iki grupta kırık hattında hematoma teşekkülü ve fibröz doku proliferasyonu görüldü (Resim 3). İkinci haftada greft uygulanmayan grupta kırık hattında fibröz doku içerisinde oluşan kırık adaları ile birleşme, Otogreft uygulanan grubun dördünde fibrokartilaginöz birleşme olduğu, birinde ise kırık doku içerisinde kemikleşme alanı olduğu saptandı. Üçüncü haftada her iki grupta kırık bölgesinde osseokondral birleşme görüldü (Resim 4). Her iki grupta dördüncü haftada osseöz kaynama, altıncı haftada ise greftsiz gruptaki bir kırık hariç diğerlerinde medüller boşluğunun oluştuğu tespit edildi.

Greft uygulanan ve greftsiz grupların kırık iyileşmesinin haftalara göre histolojik değerlendirme toplam puanları tablo I de görülmektedir. Yalnızca $p = 0.05$ alınıp X^2 önem testi yapıldığında haftalara göre gruplar arası farkın önemsiz olduğu görüldü.

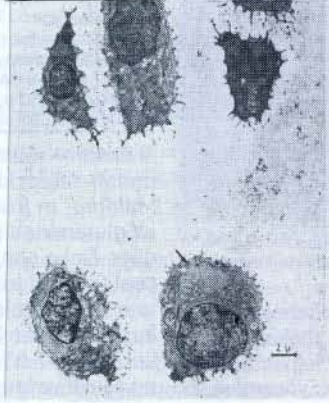
Elektron mikroskopla yapılan değerlendirmede, her iki grupta başlangıçta kondroblastların bol miktarda granüler endoplazmik retikülüm ve koyu boyanmış mitokondriyonlar ihtiva ettiği, matrikste kollogen lifler görüldü (Resim 5-6). Daha sonra mitokondriyonların renklerinin açıldığı, hipertrofik kondrositlerden matriks içine doğru ilerleyen sitoplazmik çıkıntılar oluştuğu, hücre zarı etrafının daha koyu renkli boyandığı saptandı (Resim 7). Giderek matriks içinde hidroksiapatit kristallerinde artma saptanırken (Resim 8) hipertrofik hücrelerin piknotikleştiği ve sitoplazmik uzantılarını kaybettiği izlendi (Resim 9). 4. haftada ise ortamda osteoklastlar görüldü (Resim 10).

Tartışma

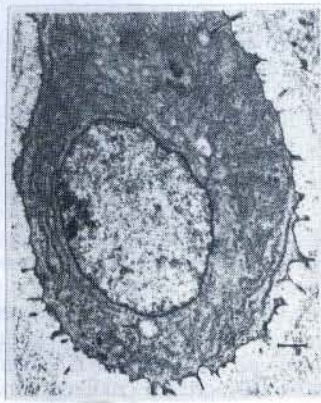
Kırık oluştuğunda hematoma, fibroblastik mezenşimal hücre aktivasyonu ve preosteoblastların aktivasyonu ile tamir olayı başlar^{2,4,11,13}



Resim 5: İlk hafta sonunda görülen kondroblast. Stoplazma sınırları düzgün olup koyu boyanmış mitokondriyonlar (okla işaretli) görülüyor.



Resim 6: Kırık doku matriks içerisinde yer alan hipertrofik kondrositler. Hücrelerde bol granüler endoplazmik retikülüm (okla işaretli) ve kollogen lifler (k) görülüyor.



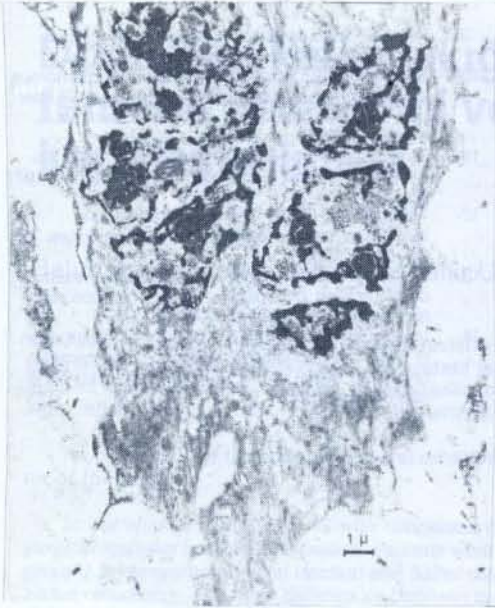
Resim 7: Hücre zarı etrafı koyu boyanma gösteren hipertrofik kondrosit. Mitokondriyonlar (okla işaretli) görülüyor ve sitoplazmik çıkıntılar (sç) oluşmuş.



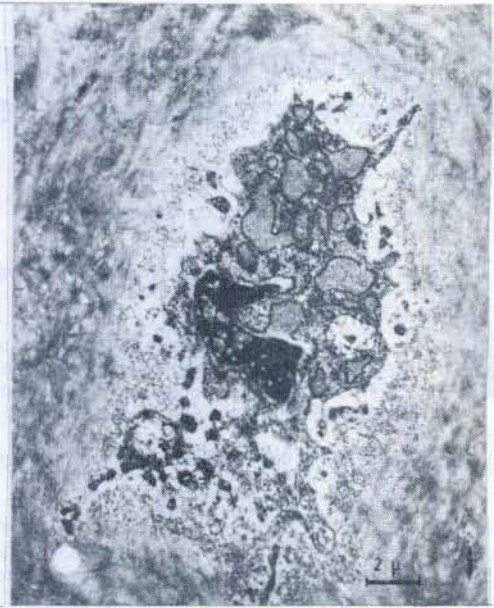
Resim 8: Kalsifiye matriksteki hidroksiapatit kristalleri (okla işaretli)

Urist¹³, Otoindüktif cevabın rezidüel embriyonik hücrelere bağlı olduğunu, bu hücrelerin postnatal hayatta kas dokusuna olan farklılaşmasını kaybederek genetik olarak kartilaj ve kemiğe farklılaşma gösterdiğini belirtmektedir. Eğer kaynamayı engelleyecek bir olay yoksa kırık, enflamatuvar, reperatif ve remodeling safhalarından geçerek kaynamaktadır^{2,4,10}. Kırık kaynamasında yaşlanma veya durma olduğunda kemik greftleri ile kaynama olayı uyarılmakta ve kaynama sağlanmaktadır^{2,4,11,13}.

Çalışmamızda otogreftli ve greftsiz gruplarda kırık kaynaması aynı sürede gerçekleşti. Otogreft, kaynama potansiyeli olan ve normal kaynama seyrini gösterecek olan kırık üzerine kaynama süresini kısaltıcı etkide bulunmadı. Türkmen¹², tavşanların tibiaları üzerinde yaptığı çalışmada otogreftlerin tavşan tibiasında kırık



Resim 10: Çok sayıda çekirdeği olan bir osteoklast.



Resim 9: Lakuna içerisinde yer alan piknotikleşmiş hücre.

rık kaynamasını hızlandırdığını belirtmektedir. Biz, yaptığımız çalışmada fibula kırığına oto-greft uygulamasının kırık kaynamasını hızlandırdığını, greftli ve greftsiz kırık kaynama süreleri arasında belirgin fark olmadığını saptadık. Kemik greftleri normal kaynama gösterecek kırıklarda kaynamayı hızlandırıcı etki göstermemektedirler. Fakat kaynaması yavaşlayan veya duran kırıklarda kaynamayı uyarıcı etki yapıp o bölgede kemiksel çatı görevi de görerek kaynama sağlamaktadırlar^{4,6,9,11,13}.

Brighton ve Hunt³, sıçanlarda yaptıkları araştırmada, büyüme kırıkdağı bölgesinde mitokondriyonların kalsiyum taşınmasında rolü olduğunu elektron mikroskopik olarak göstermişlerdir. Volpin ve arkadaşlarının¹⁴ yine sıçanlarda yaptıkları elektron mikroskopik kontrollü çalışmada mitokondriyonların kalsiyum taşınmasındaki rolü vurgulanarak hipertrofik kondrositlerin sitoplazmik çıkıntılarının matriks vezikülleri haline gelerek matriks içerisine hücreden kalsiyum taşıdıklarını, hücre zarı ve matriks vezikülü etrafında aktivite gösteren alkalen fosfataz enzimi ile bu kalsiyumun hidroksi apatit kristallerine dönüştüklerini belirtmektedirler.

Biz çalışmamızda başlangıçta tamir olayında yer alan hücrelerde bol granüler endoplazmik retikülüm, ve koyu boyanmış mitokondriyonlar gördük (Resim 5-6). Bunlar aktif osteoprogenitor hücrelerdir. Matrikste kalsifikasyon görüldüğünde mitokondriyonların renklerinde açılma olmuştu (Resim 7). Bu bulgular Brighton ve Hunt³ un çalışmalarındaki bulguları desteklemektedir. Çalışmamızda 2. haftada sonra görülmeye başlanan hipertrofik kondrositlerin stoplazma etrafının koyu boyanması, stoplazmik çı-

kıntılarının oluşarak matriks içine girmesi (Resim 7) ve matrikste bu veziküller içerisinde da hidroksi-apatit kristalleri görülmesi (Resim 8) Volpin ve arkadaşları¹⁴ nın veziküller vasıtasıyla hücre içinden matrikse taşınan kalsiyumun burada hücre zarı ve matriks vezikülleri çevresinde koyu boyanma yapan alkalen fosfataz enzim aktivitesi ile kristalleştiği görüşlerini desteklemektedir. Bol kollagen ve kalsifiye matriksin oluşturduğu bir lakuna içerisinde kalan bu eski hipertrofik hücreler aktif hücre görevlerini tamamladıkları için piknotikleşmektedirler (Resim 9). Ayrıca 4. haftada osteoklastların görülmesi (Resim 10) hücre sel seviyede remodeling fazının başladığının göstergesi olarak değerlendirildi.

Sonuç:

Çalışmamız sonucunda, ışık mikroskopik düzeyde kırık iyileşmesini geciktirecek yada engelleyecek bir durum yoksa otogreftli ve greftsiz kırık iyileşme süresinin farklı olmadığı görüldü. Elektron mikroskopik incelemede ise, mitokondriyonların kalsiyum taşınmasında rolü olduğu³, hücreden stoplazmik çıkıntılar yoluyla matriks içine taşınan kalsiyumun alkalen fosfataz enzim aktivitesiyle kristalleştiği¹⁴ görüşlerini destekler bulgular saptandı. 4. haftada osteoklastların görülmesi remodeling fazının başlamasının göstergesi olarak değerlendirildi.

Kaynaklar

- 1- Bos GD, Goldberg VM, Powell AE, Heiple KG, Ziko JM: The effect of histocompatibility matching on canine frozen bone allografts. J Bone Joint Surg 65-A: 89-96 Jan 1983

- 2- Brand RA: Fracture Healing. In Surgery of the Musculoskeletal System, ed by Everts CMcC, Churchill Livingstone, New York, 1983 pp. 1:65-87
- 3- Brighton CT, Hunt RM: The role of mitochondria in growth plate calcification as demonstrated in rachitic model. J Bone Joint Surg 60-A: 630-9 July 1978
- 4- Cruess RL, Dumont J: Healing of Bone, Tendon and ligament. In Fractures, ed by Rockwood, CA, Green DP, Vol 1 Lippincott co, Philadelphia, 1975 pp: 97-118
- 5- Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigorita VJ: The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. J Bone Joint Surg 66-A: 274-79 Feb 1984
- 6- Heppenstall RB: Bone Grafting. In Surgery of the Musculoskeletal System, ed by Everts CMcC, Churchill Livingstone, New York, 1983 pp: 1: 89-106
- 7- Millonig G: Advantages of a phosphate buffer for Os04 solutions in fixation. J Appl physics 32:1637 1961
- 8- Nilsson OS, Urist MR, Dawson EG, Schmalzried TP, Finerman CAM: Bone repair induced by bone morfogenetic protein in ulnar defects in dogs. J Bone Joint Surg 68-B:635-42 1986
- 9- Ray RD: Vascularization of bone grafts and implants. Clin Orthop 87:43-49 Sep 1972
- 10- Teitelbaum SL: Metabolic and other nontumorous disorders of the bone. In Pathology. Ed by Anderson WAD, Kissane JM, 7. ed. Vol:2, Saint Louis, Mosby Co 1977 pp: 1905-77
- 11- Turek SL: orthopaedics Principles and Their Application. 3 rd ed. Lippincott Co, Philadelphia 1977 pp: 31-81
- 12- Türkmen IM: Otojen kemik greftlerinin kırık kaynaması üzerine etkileri. Acta Orthop Traum Turc 20: 54-65 1986
- 13- Urist MR: Practical applications of basic research on bone graft physiology. A.A.O.S. Instructional course lectures Vol XXV 1976 pp: 1-26
- 14- Volpin G, Rees JA, Ali SY, Bentley G: Distribution of alkaline phosphatase activity in experimentally produced callus in rats. J Bone Joint Surg 68-B: 629-34 Aug 1986

Kaynaklar

- 1- BUCHANAN, J.R., GREER, R.B., COTLER, J.: Management Strategy for Prevention of Avascular Necrosis during Treatment of Congenital Dislocation of the Hip. J. Bone Joint Surg. 63-A: 140-146, 1981.
- 2- CHAPCHAL, G.: Indications for the Various Types of Pelvic Osteotomy. Clin. Orthop. Rel. Res. 98:111-115, 1974.
- 3- ÇAKIRGİL, G.S.: Open Reduction of Dislocation and Femoral Shortening. Campbell's Operative Orthopaedics, Mosby Company, 1892-1895, 1980.
- 4- ERIC, L.R., IGOR, L.P.: The Biomechanics of Congenital Dislocated Hips and Their Treatment. Clin. Orthop. Rel. Res. 98:27-38, 1974.
- 5- KASSER, J.R., BOWEN, R., Mac EVEN, G.D.: Varus Derotation Osteotomy in the Treatment of Persistent Dysplasia in Congenital Dislocation of the Hip. J. Bone Joint Surg. 67-A: 195-202, 1985.
- 6- KLISIC, P.: Open Reduction of Dislocation and Femoral Shortening. Campbell's Operative Orthopaedics, Mosby Company, 1891-1892, 1980.
- 7- LJUPCO, S.: Biomechanical Influence of the Innominate Osteotomy on the Growth of the Upper Part of the Femur. Clin. Orthop. Rel. Res. 98:39-40, 1974.
- 8- Mc KAY, D.: A Comparison of the Innominate and the Pericapsular Osteotomy in the Treatment of Congenital Dislocation of the Hip. Clin. Orthop. Rel. Res. 98:124-132, 1974.
- 9- SCHOENECKER, P.L., STROCKERN, W.: Congenital Dislocation of the Hip in Children. J. Bone Joint Surg. 66-A: 21-27, 1984.
- 10- TUMERY, ÜNSAÇ, B.: Doğuştan Kalça Çıkığının İliak ve Proksimal Osteotomilerle Tek Seansta Tedavisi. 8. Milli Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongre Kitabı, 252-255, 1984.
- 11- SALTER, R.B., DUBOS, J.P.: The First Fifteen Years Personal Experience with innominate Osteotomy in the Treatment of Congenital Dislocation and Subluxation of the Hip. Clin. Orthop. Rel. Res. 98:72-103, 1974.
- 12- UTTERBACK, T., Mac EVEN, G.D.: Comparison of Pelvic Osteotomies for the Surgical Correction of the Congenital Dislocated Hip. Clin. Orthop. Rel. Res. 98:104-115, 1974.