

FARKLI HIZLARDA DİSTRAKTE EDİLEN SIÇAN GASTROKNEMİUS KASINDA MEYDANA GELEN DEĞİŞİKLİKLERİN ELEKTRON MİKROSKOBU İLE İNCELENMESİ*

EVOLUATION OF THE CHANGES IN GASTROCNEMIUS MUSCLE OF RATS DISTRACTED IN DIFFERING PACES WITH ELECTRON MICROSCOPE

Gözde ACAR¹, Ayfer KAYNAR²

ÖZET

Fizyolojik sınırlar içinde, farklı hızlarda gerilim uygulanan sıçan gastrocnemius kasında meydana gelen değişikliklerin elektron mikroskobu ile incelenmesidir. Çalışmamızda kontrol, 0.50 mm/gün, 0.75 mm/gün olarak distrakte edilen üç adet yetişkin Sprouge Dawley cinsi sıçan kullanılmıştır. Distraktörler, sıçanların sağ tibialarına yerleştirildikten iki gün sonra biri 0.50 mm/gün, diğeri 0.75 mm/gün olmak üzere aynı koşullar altında bir hafta boyunca distrakte edilmiş ve hayvanlar birinci haftanın sonunda sakrifiye edilmiştir. Kontrol grubundaki sıçan ise distrakte edilmeden 5. günün sonunda sakrifiye edilmiş alınan kas örnekleri elektron mikroskopunda incelenmiştir. Farklı hızlarda distrakte edilen kas örnekleri karşılaştırıldığında görülen değişiklikler; glikojen yoğunluğu, mitokondri kümeleşmeleri, T tübüllerindeki dilatasyon miktarı ve mitokondriumlarda, endoplazmik retikulumda, damar endotelinde değişiklikler şeklinde özetlenebilir. Bu pilot çalışmada elde ettiğimiz verilerin istatistiksel değerlendirmesinin yapılabilmesi ve sonuçların kliniğe uygulanması için ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: Distraksiyon, gastrocnemius kası, elektron mikroskobu

ABSTRACT

Lengthening of the rodent tibia using an external device was performed to study gastrocnemius muscle subjected to stretch in different paces. Three male Sprouge Dawley rats were used as one for control group, others for 0.50 mm, 0.75 mm distraction per a day. The distractors were placed in right tibial bones. After the replacement of distractors one rat was set for 0.50 mm distraction through one week and the other one for 0.75 mm distraction under the same conditions. At the end of one week, rats were sacrificed. The control rat was sacrificed without being distracted after five days of replacing the distractor. We ended up with differing glycogen levels, mitochondrion gatherings and dilations of T tubules in the muscle tissue specimens of distracted rats in different velocities. Further studies are needed for statistical analysis and clinical applications.

Key Words: Distraction, gastrocnemius muscle, electron microscope

* Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Kulübü'nün 15. Uluslararası Bilimsel Kongresi'nde sunulmuştur.

¹ İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti ABD, Doktora öğrencisi.

² İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş-Çene Hastalıkları Cerrahisi ABD, Prof. Dr.

Giriş

Maksiller-mandibular deformitelerin cerrahi tedavisinde kullanılan tekniklerin gerektirdiği, fragman hareketlerindeki sınırlamalar, özellikle şiddetli iskeletsel bozukluğu olan ya da sendromlu hastalarda ortaya çıkmaktadır. Kemik fragmanlarının yeni pozisyonuna adapte olamayan yumuşak dokular relaps olasılığını arttırmakta, ayrıca bazı estetik ve fonksiyonel sorunlar ortaya çıkabilmektedir.

Distraksiyon osteogenezi kemik fragmanlarının belirli bir vektör ve gerilim altında birbirlerinden uzaklaştırılmasıyla gerçekleştirilen yeni kemik elde etme yöntemidir. Cerrahi kemik kesileri oluşturulduktan sonra kırık bölgelerine uygulanan kademeli ve kontrollü yer değiştirici kuvvetler yardımıyla kemik dokusu ve yumuşak doku miktarında artış elde edilir.

Bilim adamları, 18. yy'dan itibaren kemik dokularında uygulanan kompresyon ve germe tipi kuvvetlerin dokular üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Gavriil Ilizarov çalışmasında, Fouchard'ın 1728 yılında ekspansiyon arkını kullandığını; ancak uyguladığı traksiyon tipi ekspansiyonun diş hareketleri ile sınırlı kaldığını, kemik şekli üzerine ise ancak minimal düzeyde etki ettiğini bildirmiştir; Wescott'un ise ilk defa 1859 yılında maksiller kemiklere mekanik kuvvetler uyguladığını bir yıl sonra Angell'in aynı işlemi değişik bir yöntem ile denediğini ve maksiller kemiklerin birbirinden ayrılabilirdiğini gösterdiğini bildirmiştir (1). Aynı çalışmada Gavriil Ilizarov, ortopedide çığır açan 'distraksiyon osteogenezi' kavramını ortaya atmıştır (1). Endikasyonları; edinilmiş deformiteler (dudak damak yarığı, Pierre Robin sendromu, hemifasiyal mikrosomi), kazanılmış deformiteler (post travmatik kemik kayıpları, lokal kemik defektleri), gelişimsel deformiteler şeklinde sıralanabilir (2-6). Avantajları; elde edilmesi planlanan kemiğin herhangi bir greft materyali gerektirmemesi, ikinci bir cerrahi girişim zorunluluğunu ortadan kaldırması, kazanılan kemiğin biyomekanik ve mikrostrüktürel özelliklerinin distrakte edilmemiş kemik dokusuna oldukça yakın olması, post operatif relaps potansiyelinin diğer rekonstrüktif yöntemlere göre oldukça düşük olması şeklinde sıralanabilir. Yöntemin uzun dönemde sağladığı avantajlar ise; greft rezorpsiyonu, greft stabilitesi, donör morbiditesi, yumuşak dokunun adaptasyonu gibi sorunları ortadan kaldırması şeklindedir (7-11).

Avantajlarının yanı sıra komplike bir aygıtın yerleştirilmesi, tedavi sürecinin uzun olması, çok sıkı bir hasta hekim işbirliği gerektirmesi ve hastanın bu süre içinde büyük bir apareyi taşıması gibi zorlukları vardır. Bu zorlukları gidermek amacıyla yapılmış klinik ve deneysel birçok çalışma bulunmaktadır (7, 12, 13).

Distraksiyon hızını arttırmaya yönelik çalışmalar göstermektedir ki, yüksek hızdaki distraksiyon kuvvetleri çizgili kaslarda sarkomerlerin heterojen dizilmelerine; bu durum ise kas gücünde potansiyel zayıflığa neden olur. Ortopedik ve maksillofasiyal bölgenin rekonstrüksiyonuna yönelik uzatma operasyonlarında kemik ve kırık dokusu yanında kas dokusu göz ardı edilmemelidir. Kas dokusunun kemiğin yeni pozisyonuna adaptasyonu klinik başarı açısından kritik önem taşır, çünkü söz konusu adaptasyonun sağlanamaması sonucunda postoperatif relaps ihtimali artar. Adaptasyonla ilgili yapılan deneysel araştırmalar distraksiyon hızının sıçanda 0.50 mm/gün düzeyde olduğunu göstermektedir (8, 13), ancak fizyolojik sınırlar içinde kalmak koşuluyla kas dokusunda yeterli adaptasyon sağlanmasına olanak tanıyacak en yüksek hız olup olmadığı sorusu henüz tam olarak saptanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda optimum (0.50 mm/gün) ve optimum hızın üzerinde bir hızla (0.75 mm/gün) distrakte edilmiş sıçan gastrocnemius kasında meydana gelen değişiklikleri elektron mikroskopu ile değerlendirmeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, 3 adet Sprouge Dawley cinsi yetişkin erkek sıçan kullanıldı. Sağ tibia da planlanan kemik kazanımının gerçekleştirilebilmesi amacıyla hayvanların anatomisine uygun distraktörler kullanıldı. Bu distraktör 1 adet jack-screw (Lewa K1001, Almanya) ortodontik amaçlı kullanılan palatinal genişletici ve buna sıcak metil-metakrilat ile dökülerek eklenen iki adet L şeklinde mikroplaktan oluşmaktadır.

Hayvanların anesteziğini sağlamak için Ketanest flakon (Xylazin hydrochlorur, Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti. İstanbul, Türkiye) kullanıldı.

Ameliyatta, insülin ve 10cc'lik enjektörler, ameliyat seti, taşınabilir mikromotor ve piyasemen, 1 mm çapında fissür paslanmaz çelik frez, 500ml % 0.9 serum fizyolojik, 20 mm ½ yuvarlak ipek dikiş ipliği (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş. Trabzon,

Türkiye) kullanılmıştır. Çalışmamızda, deney hayvanlarının ameliyatları İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü (DETAE) Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı laboratuvarında ve kas dokularının elektron mikroskobu incelemeleri ise İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Bu çalışma kapsamındaki hayvan deneyleri, İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 28.11.2007 onay tarihli ve 29/2007 protokol nolu izni ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan deney hayvanları deney süresi boyunca yaklaşık 21 °C sıcaklıkta, bağıl nem oranı % 40-60, ışık periyodu 12 saat aydınlık 12 saat karanlık standardını sağlayacak şekilde ortamda, ameliyat sonrası her biri ayrı metal kafesler içerisinde muhafaza edilmişlerdir. Çalışmada kullanılan tüm hayvanlar sıçan yemi (İstanbul Yem Sanayi tarafından üretilmiştir) ve çeşme suyuyla beslenmişlerdir.

Çalışmamızda kullanılan deney hayvanlarının her birine ayrı protokol uygulanmıştır:

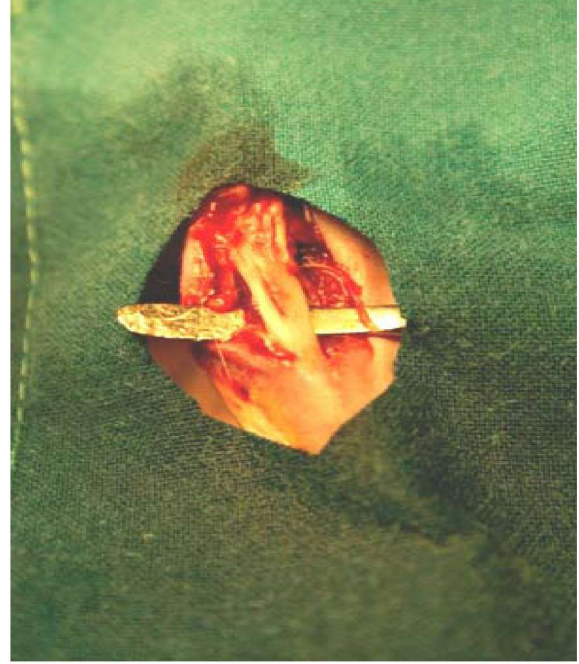
Birincisi; günde 0.5mm distrakte edilmiştir.

İkincisi; günde 0.75mm distrakte edilmiştir.

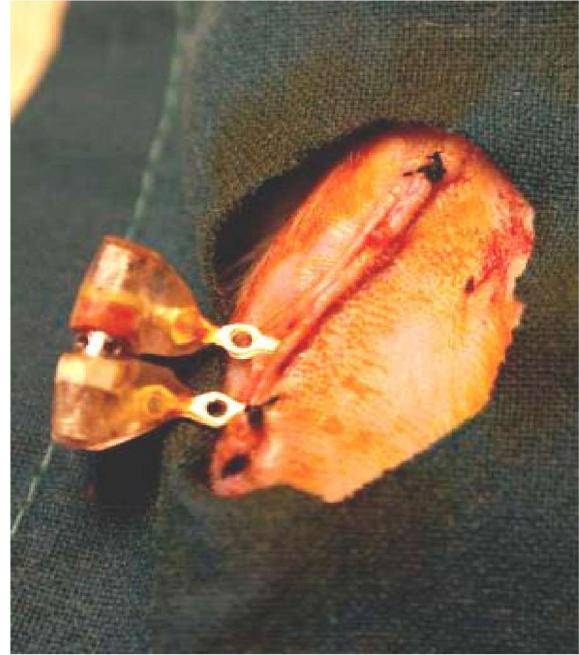
Üçüncüsü; kontrol için distrakte edilmemiştir.

Deney hayvanlarında tibia kemiğini açığa çıkartmak için yaklaşık 20-25 mm uzunluğunda cilt-cilt altı kesisi yapıldıktan sonra kütü diseksiyon ile yumuşak dokular ekarte edilerek tibianın medial yüzeyi periost sıyrılarak açığa çıkartıldı (Resim 1). Middiafizeal kortikotomi yapılarak mikrovidalar yardımıyla distraktör adapte edildikten sonra ameliyat sahası dikişlerle kapatıldı (Resim 2).

Deney hayvanları distraktör yerleştirildikten sonra 5 günlük post-operatif döneme alındı ve bu dönem sonunda 3. sıçan sakrifiye edildi. 1. ve 2. sıçanlar ise post-operatif dönem sonunda 7 günlük distraksiyon periyodunu takiben 8. günde sakrifiye edildi. Sıçanlardan alınan kas örnekleri elektron mikroskobunda incelenmeye hazır hale getirildi.



Şekil 1: Tibianın medial yüzeyi.

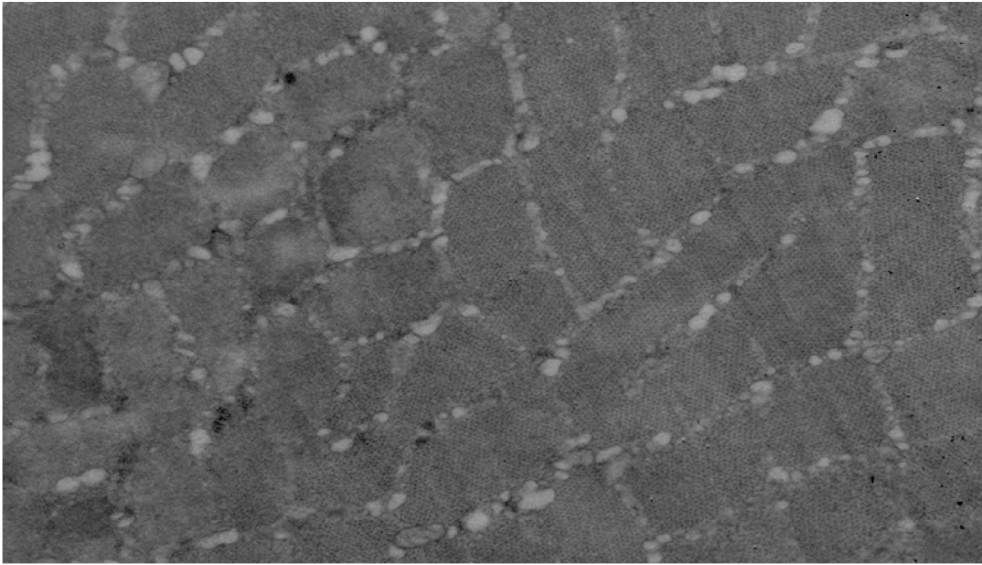


Şekil 2: Tibiaya distraktörün yerleştirilmesi.

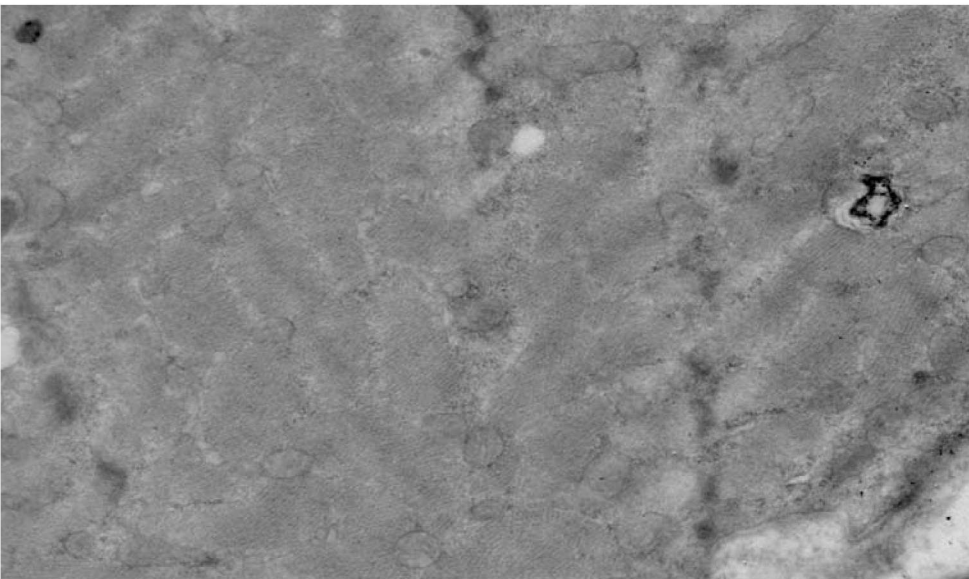
Elektron mikroskopunda inceleme için alınan kas örnekleri önce, pH 7.4 olan fosfat tamponlu %2.5 gluteraldehit daha sonra da %1 osmium tetraoksit çözeltisinde tespit edildi. Birinci tespiti takiben artan alkol serisinden (%30-50-70-90-99.9) geçirilen parçalar propilen oksit ara geçişi kullanılarak kademeli olarak Epon-812 (Fluka, Sigma Aldrich, katalog.) gömme ortamına alındı. Plastik bloklardan alınan yaklaşık 600 nm.lik ince kesitler uranil asetat ve Reynauld's solüsyonları ile ikili boyamayı takiben elektron mikroskopunda (Jeol JEM 1011) incelendi ve elektron mikro fotoğrafları elde edildi.

BULGULAR

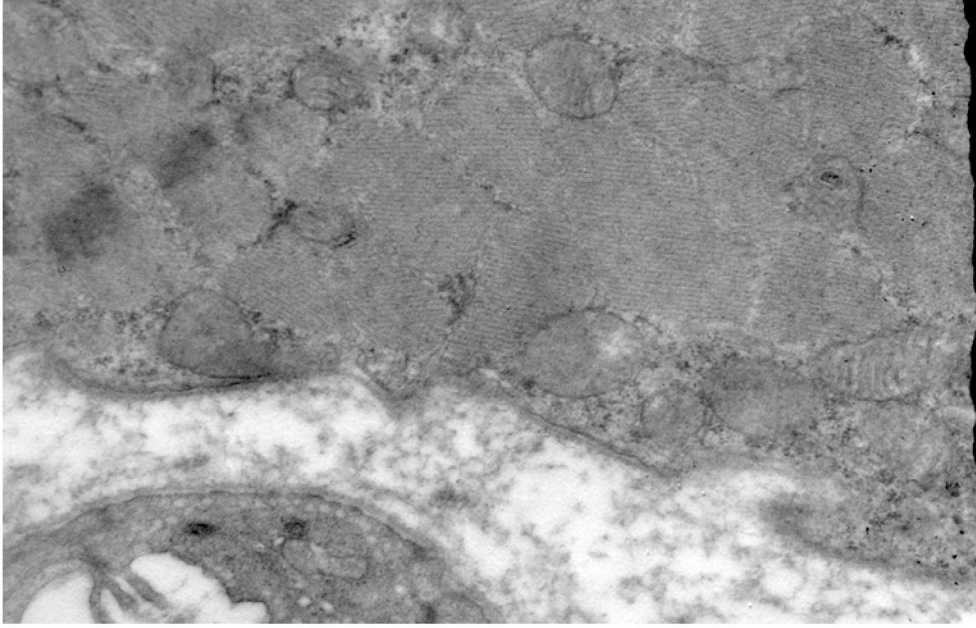
1. sıçanda miyoflaman düzeninde bozulma gözlenmemiştir, ancak miyofibrillerin çevresindeki endoplazma retikulumu sarmıçlarında hafif diltasyon dikkati çekmiştir. Genel olarak miyofibril yapı bütünlüğünün korunduğu gözlenmiştir (Resim 3). Yine bu sıçanda kontrol grubuna göre, seyrek olmakla beraber bazı mitokondriumlarda lameller inklüzyon görünümü taşıyan dejenerasyon bulgusu saptanmış (Resim 4) ve glikojen yoğunluğunun düşük olduğu gözlenmiştir (Resim 5).



Şekil 3: Miyofilamanların yapı bütünlüğü bozulmamıştır. X400.



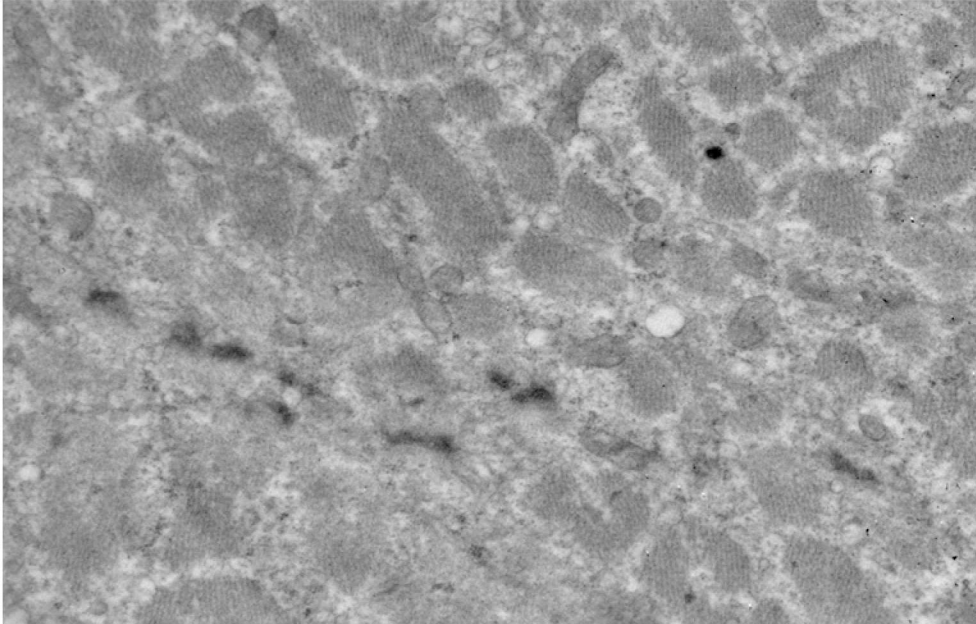
Şekil 4: Mitokondriumlarda lameller inklüzyon görünümü taşıyan dejenerasyon bulgusu. X200.



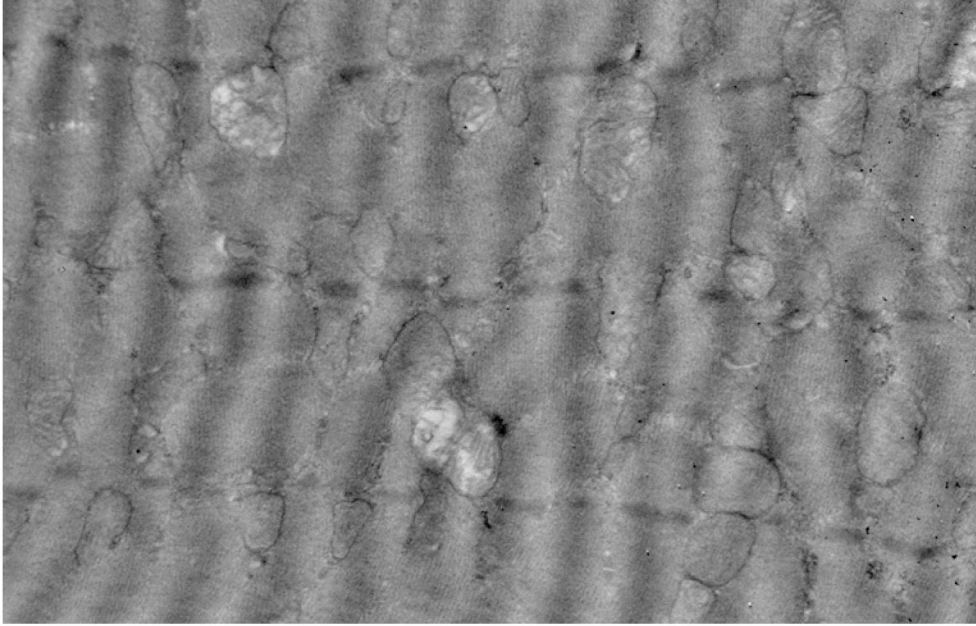
Şekil 5: Düşük yoğunlukta glikojen varlığı. X400

2. sıçanda dağılmış miyoflamanlara bağlı miyofibriloz görüntüsü, miyofibriller arasında ödem ve Z çizgilerinde düzensizleşme gözlenmiştir (Resim 6). Kontrol grubuna göre; mitokondrium kristallerinde dejenerasyon gözlenmiştir (Resim 7).

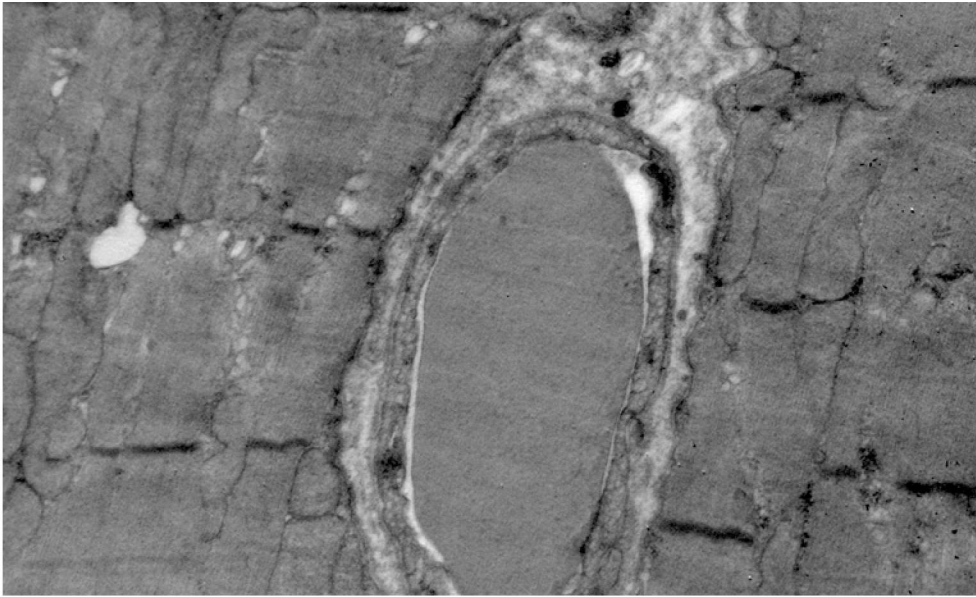
Bu sıçanda kan damarlarının endotel hücrelerinde pinostoz vesiküllerinin sayısında artış ve kapiller kan damarları içinde eritrositlerin varlığıyla belirlenen dolaşım yavaşlaması gözlenmiştir (Resim 8).



Şekil 6: Miyofibriller arasında ödem ve Z çizgilerinde düzensizleşme. X200.



Şekil 7: Mitokondrium kristalarında dejenerasyon. X400.



Şekil 8: Endotel hücrelerinde pinositoz vesikülleri sayısında artış. X400

TARTIŞMA

Kawamura çalışmasında başlangıç uzunluğunun %10'una kadar yapılan distraksiyonun yumuşak dokuda herhangi bir zarara yol açmadığını bildirmiştir, %20 den sonraki uzatmalarda geri dönüşümsüz endomisyal fibrosiz, nukleus internalizasyonu belirlemiştir (15). Örneklerimizde fibrosiz bulgusu görmemekle birlikte ödem ve

endoplazma retikulum sarnıçlarında dilatasyon gibi hücre hasarının öncül bulgularına rastladık. Bu bulgular, izleme süresinin uzatılması durumunda fibrozisle sonuçlanacak süreci ifade etmektedir. Ilizarov, gerilim kuvvetlerine maruz kalan yumuşak dokuda gerçekleştirdiği elektron mikroskobu çalışmalarında hipertrofi, mitokondriumlarda genişleme ve buna bağlı olarak oksidatif enzim aktivitesinde artış belirlemiştir (1, 16). Biz de, günde

0.5 mm distrahte edilen örnekte daha seyrek olmak üzere mitokondriumda lameller inklüzyon görünümü oluşturan vesiküllere rastladık. Ilizarov aynı çalışmada sürekli gerilim altındaki yumuşak dokuda hücre aktivitesinde artış bildirmiş (1), bizim çalışmamızda ise, hücresel aktivite artışını doğrulayacak biçimde her iki örneğin glikojen miktarının kontrol örneğine göre düşük olduğu saptanmıştır. Hubka, kas dokusu üzerindeki stimulusun satellit (uydu) hücrelerin mitotik aktivitesinde artışa yol açtığını ve fizyolojik sınırlar içinde distraksiyon kuvvetlerinin miyofibrillerde artışa neden olduğu ancak bu kuvvetlerin fizyolojik sınırları aşması durumunda miyofibrillerde artma ile birlikte Z bandlarında düzensizleşme bildirmiştir (17). Bizim örneklerimizde 0.50 mm hızda genel olarak miyofibril yapısının bütünlüğünde bozulma gözlemlenmemiştir, ancak 0.75 mm hızda miyofibriloliz gözlenmiştir. Bu sonuçlar dikkate alındığında kas dokusu açısından da optimum distraksiyon hızının 0.5 mm olduğu düşünülebilir. Dokunun morfolojik yapısının korunmasında organel fonksiyonları esastır. Denerve edilen kasta yapısal değişim ve bunun sonucunda distrofi meydana geldiği bildirilmiştir (8). Ayrıca, kas dokusundaki beslenmenin dokunun morfolojik yapısı için gerekli faktörlerden biri olduğu göz ardı edilmemelidir. Yapılan çalışmalarda distrahte edilen kas dokusundaki damarsal yapının elektron mikroskopundaki değerlendirmelerine rastlayamadık, ancak Cohen ve arkadaşları distrahte edilen kemikte endotelial büyüme faktörlerinde anlamlı derecede artış bildirmişlerdir (12). Benzer artışın gerilim kuvvetlerine maruz kalan kas dokusunda da ortaya çıkması beklenirken bizim örneklerimizde bu yönde bir bulguya rastlanmamıştır. 0.75 mm hızda distrahte edilen örneklerde endotelial sitoplazması içinde pinostatik vesikül sayısında ileri derecede artış ve kapiller içinde eritrositlerin varlığıyla belirlenen dolaşım yavaşlaması gözlenmiştir. Bu sonuçların literatürde kemik dokusunda saptanan endotelial büyüme faktör artışına paralel olmadığı düşünülse de yumuşak dokunun gerilim sınırları ve çalışmanın erken dönem değişiklikleri kapsadığı göz önüne alındığında uzun dönemli araştırmaların yapılması gereği ortaya çıkmaktadır.

SONUÇ

- Kas dokusunun distraksiyon kuvvetlerine verdiği tepki kemik dokusundan farklıdır.

- Sonuçlarımız literatürle paralellik göstermektedir.
- Kas dokusundaki elektron mikroskobu çalışmalarında ağırlıklı olarak miyofibriller incelenmiştir. Çalışmamızda literatürdeki verilere ilave olarak **mitokondride, endoplazma retikulumunda** ve **damar endotelinde** değişiklikler saptadık.
- İstatistiksel değerlendirme için 'n' sayısı artırılmalıdır.
- Kas ve damar yapılarındaki uzun dönem değişikliklerin incelenmesi kas dokusunun adaptasyon sürecinin değerlendirilmesi açısından önem taşır.

KAYNAKLAR

1. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. Clin Orthop 1989; 238: 249.
2. Mc Carthy JG, Schrieber J, Karp N: Lengthening of the human mandible by gradual distraction. Plast Reconstr Surg 1993 Aug; 92 (2): 372-3.
3. Bell WH, Harper Rp, Gonzales M, Cherkashin AM, Samchukov ML. Distraction osteogenesis to widen the mandible. Br J Oral Maxillofac Surg 1997 Feb; 35 (1): 11-19.
4. Block MS, Cervini D, Chang A, Gottsegen GB. Anterior maxillary advancement using tooth-supported distraction osteogenesis. J Oral Maxillofac Surg 1995; 53: 561-5.
5. Sproul JT, Price CT. Recent advances in limb lengthening. Part II biological advances. Orthopaedic Rev 1992; 21: 425-430.
6. Hasse, A.R., M. Pörksen, C.E. Zimmermann. Bilateral mandibular distraction in adult dogs with an epiperiosteal distractor. Br J Oral Maxillofac Surg 2005. 43: 105-112.
7. Amino DJ, Goguen LA, Karmody CS. Distraction osteogenesis for reconstruction of mandibular symphyseal defects. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1994; 120: 911-916.
8. Knothe Tate, M.L., P. Niederer, U. Knothe. In vivo tracer transport through the lacunocanalicular system of rat bone in an

- environment devoid of mechanical loading. *Bone* 1998; 22: 107-117.
9. Constantino PD, Friedman CD, Shindo ML: Experimental mandibular regrowth by distraction osteogenesis – long term results. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 110: 511-18.
 10. El-Hakim IE, Azim AMA, El-hassan MFA, Maree SM. Preliminary investigation into the effects of electrical stimulation on mandibular distraction osteogenesis in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 33: 42-47.
 11. Gateno J, Allen ME, Teichgraeber JF, Messesmith ML. An in vitro study of the accuracy of a new protocol for planning distraction osteogenesis of the mandible. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58: 985-900.
 12. Cohen SR, Tutrick RE, Burnstein F: Distraction osteogenesis of the human craniofacial skeleton: initial experience with a new distraction system. *J Craniomaxillofac Surg* 1995; 6: 368-74.
 13. Devkota P, Zeng BF, Tang JF, Fan CY. Histological changes of the skeletal muscle due to muscle tension: A study in rats. *Kathmandu university Medical Journal* 2005; 3 (3) 281-284.
 14. Best TM, Loitz-Ramage B, Corr DT, Vanderby R. Hyperbaric oxygen in the treatment of acute muscle stretch injuries, Results in animal model. *Am J sports Med* 1998; 26 (3): 367-372.
 15. Kawamura B, Hosono T, Takahashi T, Yau T, Kobayashi Y, Shibata N, Shinoda Y. Limb lengthening by means of subcutaneous osteotomy. *J Bone Joint Surg* 1968; 50 (A): 851.
 16. Ilizarov GA: The principles of the Ilizarov method. *Bull Hosp Joint Dis Orthop Inst* 1988; 48: 1-12.
 17. Hubka MJ, Taylor JAM, Schultz GD, Traina AD: Lumbar intervertebral disc herniation: chiropractic management using flexion, extension, and rotational manipulative therapy. *Chiropractic Technique* 1991; 3 (1): 5-12.

Yazışma Adresi:

Gözde ACAR

İstanbul Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi

Endodonti ABD

Çapa-34093 / İstanbul

Tel: 0533 432 26 56

e-mail: gozdeacar2@hotmail.com