



Doksorubisinin iskelet kasına etkileri: Deneysel çalışma

The effect of doxorubicin on skeletal muscle: an experimental study

Emre ÇULLU,¹ İlhan ÖZKAN,¹ Nil ÇUHACI,² Bülent ALPARSLAN,
¹Emel DİKİCİOĞLU,² Ş. Öner ŞAVK¹

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, ²Patoloji Anabilim Dalı

Amaç: İstemsiz ve kontrolsüz kas kasılması ile seyreden hastalıkların konservatif tedavisinde kullanılan botulinum toksininin spastisiteyi çözücü etkisi ortalama üç aydır ve tedavi maliyeti oldukça yüksektir. Bu deneysel çalışmada, kasta nekroza yol açan yan etkisinin kalıcı olduğu bildirilen ve ucuz bir antikanserojen olan doksorubisinin iskelet kasına olan etkisi incelendi.

Çalışma planı: Altı adet erkek Wistar sıçanın sol kuadriseps kaslarına, genel anestezi altında bir santimetrelik bir insizyonla 0.02 mg/ 0.5 ml, diğer altı sıçanın sol kuadriseps kaslarına ise 0.05 mg/ 0.5 ml doksorubisin enjekte edildi. Sıçanların sağ kuadriseps kaslarına ise 0.5 ml %0.9'luk serum fizyolojik enjeksiyonu ile kontrol grubu oluşturuldu. Yedi gün sonra tüm sıçanlar yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi. Işık mikroskobu altında kas dokusunda hasar olup olmadığı ve varsa şiddeti araştırıldı.

Sonuçlar: Histopatolojik incelemede 0.02 mg doksorubisin enjekte edilen kaslarda ortalama %3 oranında kas nekrozu ve hafif enflamasyon bulguları varken, 0.05 mg doksorubisin enjekte edilen kaslarda ortalama %11 kas nekrozu ve orta, ağır enflamasyon bulguları saptandı. Kontrol grubu kaslarda histopatolojik bulgular normal idi.

Çıkarımlar: Doksorubisinin kemomiyektomi etkisi nedeniyle ortopedide spastisite ile seyreden hastalıkların tedavisinde cerrahiye başvurmadan yeni ufuklar açabileceği görüşüne varıldı.

Anahtar sözcükler: Hayvan; doksorubisin/terapötik kullanım/farmakoloji; kas/metabolizma/fizyoloji/ilaç etkisi; kas denervasyonu/yöntem; botulinum toksini/terapötik kullanım.

Objectives: The spasticity-solving effect of botulinum toxin is utilized in the conservative treatment of involuntary and uncontrolled muscle diseases. However, this effect is about of three-month duration, with reasonably high cost. Doxorubicin is a cheap antineoplastic agent reported to cause muscle necrosis. This experimental study sought to investigate the effect of doxorubicin on the skeletal muscle.

Methods: Twelve male Wistar rats were assigned to doxorubicin injection of 0.02 mg/ 0.5 ml (n=6) and 0.05 mg/ 0.5 ml (n=6) into the left quadriceps muscles through a skin incision of one centimeter under general anesthesia. The right quadriceps muscles of the same rats were assigned as controls and 0.5 ml 0.9% NaCl solution was injected. All the rats were sacrificed under high dose anesthesia seven days later and changes in the muscle tissue were evaluated under light microscope.

Results: Histopathologically, doxorubicin injection of 0.02 mg resulted in a mean of 3% muscle necrosis and slight inflammation, whereas with 0.05 mg doxorubicin, muscle necrosis was 11% and moderate to severe inflammation was noted. Histopathological findings were normal in control muscles.

Conclusion: With its chemomyectomy effect, doxorubicin may open new horizons in the treatment of spasticity in orthopaedics, without the need for surgical intervention.

Key words: Animal; doxorubicin/therapeutic use/pharmacology; muscles/metabolism/physiology/drug effects; muscle denervation/methods; botulinum toxins/therapeutic use.

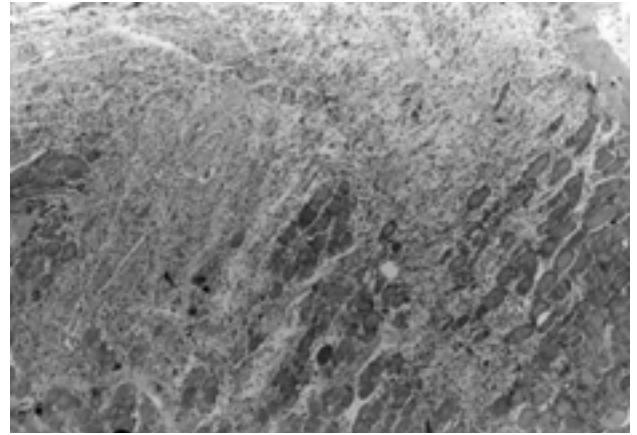
Kasların veya kas gruplarının istemsiz ve kontrolsüz kasılmasıyla seyreden birçok hastalık vardır. Nörolojik ve oftalmolojik bu tip kas hastalıklarının tedavisinde, geçici olarak bir fonksiyonel denervasyon etkisi gösteren botulinum toksininden yararlanılmaktadır.^[1-4] Kas içerisinde sinirlerin dağıldığı bölgeye yakın olarak enjekte edilen botulinum toksini, selektif olarak kolinerjik sinir uçları tarafından tutularak birkaç ay süre ile bu terminallerde presinaptik asetil kolin serbestleşmesini engeller. Toksin, gerek sinir terminallerinde gerekse nöromusküler bileşelerde harabiyet yapmaksızın bunlara bağlanarak etkili bir nöromusküler blok oluşturur.^[5,6] Son yıllarda beyin felçli çocukların tedavisinde spastisiteyi azaltmak, daha iyi bir hareket ve daha fazla bağımsızlık sağlamak, kas kontraktürleri ve ortopedik deformiteleri önlemek amacıyla botulinum toksininden yararlanılmaya çalışılmaktadır.^[6,7] Ancak bu toksinin maliyetinin çok yüksek olması ve 2-3 ay gibi kısa etkili olması nedeniyle, daha ucuz ve etkisi kalıcı olan başka kimyasal ajanlara yönelinmiştir. Bu amaçla, antimotik ve antimetabolik özellikleri nedeniyle kanser tedavisinde kullanılan doksorubisinin kas dokusu üzerine etkisi araştırılmıştır. Doza bağlı olarak kardiyomiopati yaptığı bilinen doksorubisinin iskelet kasında da kemomiyektomi ve kemodenervasyon özelliklerinin olduğu görülmüştür.^[8-14] Doksorubisin enjeksiyonu sonrası gelişen kas hücresi kaybı kemomiyektomi olarak tanımlanmıştır.

Bu deneysel çalışma, doksorubisinden ortopedik spastik kas hastalıklarında da yararlanılabileceği düşüncesiyle düzenlenmiştir.

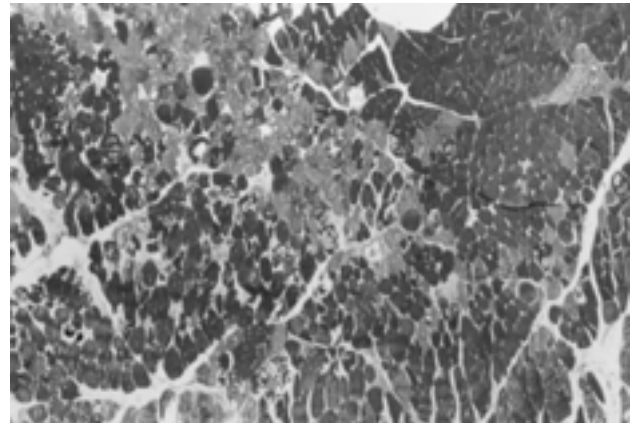
Gereç ve yöntem

Bu çalışmada, on haftalık on iki erkek Wistar cinsi sıçanda iskelet kasına enjekte edilen doksorubisinin akut etkisi araştırıldı. Ortalama ağırlığı 156 gram (132-178 gr) olan sıçanların yarısına sol taraf kuadriseps kaslarına 0.02 mg/0.5 ml, diğer yarısına ise 0.05 mg/0.5 ml doksorubisin enjekte edildi. Deneklerin sağ tarafları kontrol grubu olarak kabul edilip kuadriseps kaslarına 0.5 ml %0.9'luk serum fizyolojik uygulandı. Enjeksiyonların tümü, genel anestezi altında bir cm'lik cilt insizyonu ile kuadriseps kasları içine yapıldı. Ketamin hidroklorid (50 mg/ml), atropin (1 mg/ml) ve diazepam (5 mg/ml) karışımından oluşan anestezi madde intraperitoneal yolla, 100 gram ağırlığa 0.25 ml olacak şekilde verildi. Profilaksi amacıyla anestezi madde karışımına 100 gram ağır-

lığa 4 mg olacak şekilde sefazolin eklendi. Yedi gün sonra tüm sıçanlar yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi. Deneklerin sağ ve sol kuadriseps kasları çıkarıldıktan sonra uzun eksenleri boyunca gerilerek, 72 saat süre ile %4'lük nötralize formalin solüsyonunda bekletildi. Tüm kuadriseps kasları, enjeksiyon dozları ve taraflarını bilmeyen bir patolog tarafından tabibe alınıp değerlendirildi. Her bir örnekten eşit sayıda vertikal ve horizontal kesitler alınarak hematoksil-eosin, Masson trikrom ve periodik acit Schiff (PAS) ile boyandı. Işık mikroskobu altında kas dokusunda hasar olup olmadığı ve varsa şiddeti araştırıldı. Preparattaki toplam kas doku alanı ve hasar alanı, mikrometrik oküler ile mikrom² cinsinden ölçülerek, hasar alanının toplam doku alanına oranı yüzde olarak



Şekil 1. L5 no'lu olguda hasar alanı. Yoğun yangısal infiltrasyon, fibrozis, nekrotik kas fibrilleri (H-Ex54).



Şekil 2. L4 no'lu olguda nekrotik fibrillerde boyanma kaybı, sağ üstte normal görünümli kas fibrilleri (Masson trikromx54).

Tablo 1. Doksorubisin enjeksiyonu yapılan kuadriseps örneklerinde histopatolojik değişikliklerin şiddeti ve hasarlı alanların normal dokuya oranı

	Sitoplazmik vakuolizasyon	Fragmentasyon	Nekrotik Fibril	Enflamasyon		Fibrozis	Hasarlı alan
				Ödem	Enfl. hücre		
L1	++	++	+	++	++	-	5
L2	+	+	-	+	+	-	1
L3	+	-	-	+	+	-	1
L4	-	++	+	-	++	-	2
L5	++	++	+	++	++	-	5
L6	+	+	-	+	+	-	1
L7	+	+++	++	+	++	+	15
L8	++	++	+++	+++	+++	+	10
L9	++	+++	++	++	+++	-	7
L10	+	+++	++	+	++	+	14
L11	++	++	+++	+++	+++	+	11
L12	++	+++	++	++	+++	-	8

L1- L6 örnekleri 0.02 mg enjeksiyon sonuçları; L7-L12 örnekleri 0.05 m. enjeksiyon sonuçları. (-) yok, (+) az, (++) orta derece, (+++) belirgin.

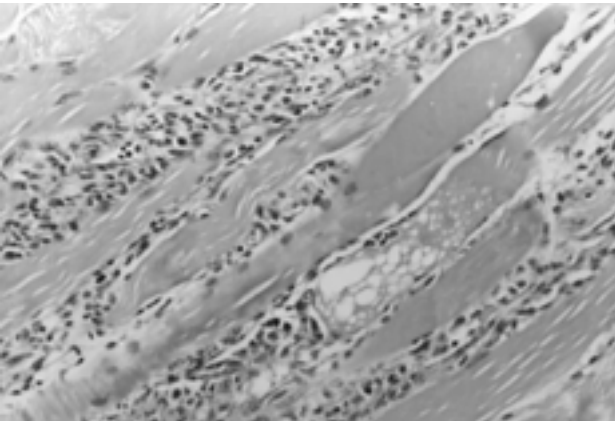
hesaplandı. Ayrıca hasar alanında, kas fibrillerinde sitoplazmik vakuolizasyon, fragmentasyon, nekroz, enflamasyon (ödem ve enflamatuvar hücreler) ve fibrozis gelişip gelişmediği araştırıldı. Histolojik bulgular, az (+), orta derecede (++) ve belirgin (+++) hasar şeklinde değerlendirildi.

Sonuçlar

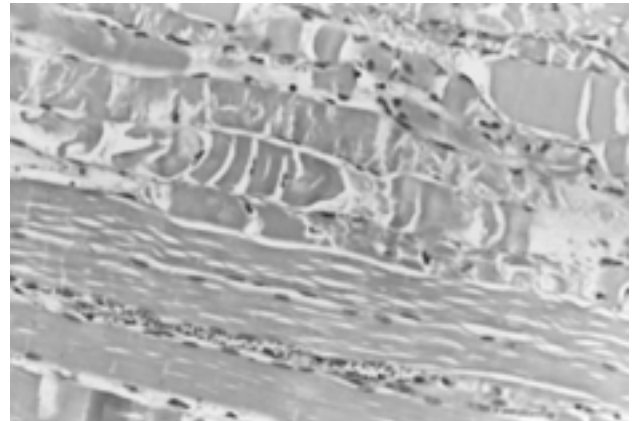
Doksorubisin enjeksiyonundan sonra deneklerin hiçbirinde ciltte nekroz, ülser ve enfeksiyon gözlenmedi. Kontrol olarak serum fizyolojik enjeksiyonu yapılan sağ kuadriseps kaslarının histolojik incelemeleri normal yapıda idi. Kastaki hasar alanı 0.02 mg/ 0.5 ml doksorubisin enjeksiyonu yapılan örneklerde ortalama %3 (%1-%5) ile zayıf ve orta düzeyde idi (Tablo 1).

Doksorubisin dozunun 0.05 mg/0.5 ml uygulandığı örneklerde ise hasar alanının daha geniş olduğu ve ortalama %11 (%7-%15) oranına ulaştığı saptandı. Enflamasyon şiddetinin belirgin derecede arttığı, kas fibrillerinde geri dönüşsüz hasar bulgularının (fragmentasyon) ve nekrozun öne çıktığı, fibrozisin başladığı dikkati çekti (Tablo 1) (Şekil 1,2,3,4).

Doksorubisin dozunun 0.05 mg/0.5 ml uygulandığı örneklerde ise hasar alanının daha geniş olduğu ve ortalama %11 (%7-%15) oranına ulaştığı saptandı. Enflamasyon şiddetinin belirgin derecede arttığı, kas fibrillerinde geri dönüşsüz hasar bulgularının (fragmentasyon) ve nekrozun öne çıktığı, fibrozisin başladığı dikkati çekti (Tablo 1) (Şekil 1,2,3,4).



Şekil 3. L5 no'lu olguda kas fibrilinde stoplazmik vakuolizasyon ve yangısal hücre infiltrasyonu (H-Ex270).



Şekil 4. L6 no'lu olguda kas fibrillerinde fragmentasyon (H-Ex270).

Tartışma

Son yıllarda beyin felci tedavisinde kullanılmaya başlanan botulinum toksininin çok pahalı olması ve etkisinin 2-6 ay gibi kısa süreli olması yaygın olarak kullanımını engellemektedir.^[6,10,14] Bu toksin enjeksiyonunun eğitilmiş ve lisanslı kişilerce yapılması zorunluluğu da kullanımını bir ölçüde kısıtlayıcı bir etken dir.^[3] Öte yandan, yapılan araştırmalar doksorubisinin kemomiyektomi etkisinin kalıcı olduğunu göstermektedir. Kas içi enjeksiyonu sonrası, etkilenen kas liflerinde geri dönüşümsüz lezyonlara yol açtığı bildirilmiştir.^[8,10,11,13] Ayrıca doksorubisin, botulinum toksinine oranla çok daha ucuzdur.

Doksorubisin antimitotik ve antimetabolik özelliği nedeniyle günümüzde kanser tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. *Streptomyces peucetius* mikroorganizmasının doğal olarak oluşturduğu sitotoksik üründen elde edilen bir antibiyotiktir. Bu ajan, DNA'ya bağlanarak mitozu ve nükleik asit sentezini engellerken, RNA'ya da bağlanarak protein sentezini önler.

Doksorubisinin kanser tedavisi sırasında kardiyomiopati, mukoza iltihabına bağlı bulantı, kusma ve diyare ve flebosklerozis gibi yan etkiler bildirilmiştir.^[15] Doksorubisin, doza bağlı olarak kardiyomiopati ve cilt lezyonlarına neden olur. Damar dışına çıktığı hallerde hızla eritematöz lezyona yol açar ve bir hafta içinde bu bölgede nekroz ve ülserasyon gelişir. Ülserin büyüklüğü ve derinliği damar dışına kaçan doksorubisin miktarı ile doğru orantılıdır.^[16,17] Yaptığımız çalışmada deneklerin hiçbirinde kas içi enjeksiyonlardan sonra cilt sorunu oluşmaması uyguladığımız dozun düşük olmasına bağlanmıştır.

Doksorubisinin kardiyomiopati ve cilt lezyonlarına yol açan komplikasyonlarının bilinmesine karşın, kas dokusuna yönelik etkileri üzerinde fazla durulmamıştır.^[18] Zorzato ve ark.^[19] iskelet kasına yapılan doksorubisin enjeksiyonunun, sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımını bozarak kas dokusunda hasara yol açtığını göstermiştir. Doksorubisinin kemomiyektomi ve kemodenervasyon özelliğinde bu mekanizma rol oynar.^[9-11,15,20,21] McLoon ve ark.,^[22] kas içine doksorubisin enjeksiyonu sonrasında beşinci dakikada miyofibriler bozulmanın başladığını, dördüncü günde değişikliklerin yerleştiğini bildirmişlerdir.

Doksorubisin enjeksiyonu sonrasında kas kesitlerinin histolojik incelemesinde, sitoplazmik vakuoli-

zasyon, ödem ve miyofibriler düzensizlikler gözlenmiştir. Enjeksiyon bölgesinde birçok nekrotik kas hücresi saptanmıştır. Masson trikrom ile boyanan kesitlerde koyu boyanan hyalin fibriller vardır. Kas liflerinde belirgin fragmentasyon ve bozulma, toksik hasarın kasa verdiği aşırı zararın belirtileridir.^[10] Doksorubisinin kemomiyektomi ve fonksiyonel kemodenervasyon etkisi bu şekilde ortaya çıkmaktadır.

Doksorubisin enjeksiyonundan sonra kastaki akut değişikliklerin ilk hafta içerisinde ortaya çıkması nedeniyle çalışmamızda denekler yedinci günde sakrifiye edilmişlerdir. Çalışmamızda, kuadriseps kasları içerisine enjekte edilen doksorubisin sonrasında kasta oluşan doku hasarının doz ile doğru orantılı arttığı saptanmıştır: 0.5 ml'de 0.02 mg doksorubisin ile oluşan kas doku hasarı ortalama %3 oranında iken, 0.05 mg dozda %11'e ulaşmıştır. Doz artışı ile birlikte kasta oluşan hasarın şiddetinin de arttığı belirlenmiştir (Tablo 1.) Çalışmamızda, kemomiyektomi ve kemodenervasyon etkisinin doksorubisin dozu ile arttığı gösterilmesine rağmen, denek sayısının azlığı nedeniyle bu bulgu istatistiksel analizlerle yorumlanamamıştır.

Antikanserojen bir ajanın kemomiyektomi amacıyla ortopedide kullanımına literatürde rastlanmamıştır. Spastik beyin felci ve tortikolis gibi hastalıklarda, kaslarda cerrahiye başvurmada kalıcı bir etki elde edilebilmesi ortopedide yeni ufuklar açabilecektir. Bu konuda daha yoğun ve geniş kapsamlı çalışmaların gerektiği inancındayız.

Kaynaklar

1. Greene P. Use of botulinum toxin injections in the treatment of blepharospasm, hemifacial spasm, and apraxia of eyelid opening. In: Brin MF, editor. Symposium on the Clinical Use of Botulinum Toxin. Columbia University College of Physicians & Surgeons; 1991 October 12; New York. New York: 1991. p. 45-50.
2. Greene P. Use of botulinum toxin in the treatment of torticollis. In: Brin MF, editor. Symposium on the Clinical Use of Botulinum Toxin. Columbia University College of Physicians & Surgeons; 1991 October 12; New York. New York: 1991. p. 53-8.
3. Jankovic J, Brin MF. Therapeutic uses of botulinum toxin. N Engl J Med 1991;324:1186-94.
4. Pullman SL. Limb dystonia: treatment with botulinum toxin. In: Brin MF, editor. Symposium on the Clinical Use of Botulinum Toxin. Columbia University College of Physicians & Surgeons; 1991 October 12; New York. New York: 1991. p. 81-5.
5. Brin MF. Treatment of dystonia including Botox. Botox: chemistry, pharmacology, toxicity, immunology. In: Brin MF, editor. Symposium on the Clinical Use of Botulinum Toxin. Columbia University College of Physicians & Surgeons;

- 1991 October 12; New York. New York: 1991. p. 17-25.
6. Massin M, Allington N. Role of exercise testing in the functional assessment of cerebral palsy children after botulinum A toxin injection. *J Pediatr Orthop* 1999;19:362-5.
 7. Corry IS, Cosgrove AP, Duffy CM, McNeill S, Taylor TC, Graham HK. Botulinum toxin A compared with stretching casts in the treatment of spastic equinus: a randomised prospective trial. *J Pediatr Orthop* 1998;18:304-11.
 8. Doroshow JH, Tallent C, Schechter JE. Ultrastructural features of Adriamycin-induced skeletal and cardiac muscle toxicity. *Am J Pathol* 1985;118:288-97.
 9. McLoon LK, Bauer G, Wirtschafter J. Quantification of muscle loss in the doxorubicin-treated orbicularis oculi of the monkey. Effect of local injection of doxorubicin into the eyelid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:1667-73.
 10. McLoon LK, Wirtschafter J. Doxorubicin chemomyectomy: injection of monkey orbicularis oculi results in selective muscle injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:1854-9.
 11. McLoon LK, Wirtschafter J, Cameron JD. Muscle loss from doxorubicin injections into the eyelids of a patient with blepharospasm. *Am J Ophthalmol* 1993;116:646-8.
 12. McLoon LK, Kirsch JD, Cameron S, Wirtschafter J. Injection of doxorubicin into rabbit eyelid does not result in loss of facial motor neurons. *Brain Res* 1994;641:105-10.
 13. Özkan SB, Can D, Bilgili H, Söylev MF, Arsan AK, Üstün H. The effect of doxorubicin on extraocular muscle: an experimental study. In: Spiritus M, editor. Transactions. 24th Meeting of European Strabismological Association; 1997 Sep; Vilamoura, Portugal. Buren, The Netherlands: Æolus Press; 1997. p. 434-9.
 14. Wirtschafter JD. Clinical doxorubicin chemomyectomy. An experimental treatment for benign essential blepharospasm and hemifacial spasm. *Ophthalmology* 1991;98:357-66.
 15. Arky R. Physicians' desk reference. 52nd editions. Montvale, NJ: Medical Economics Company, 1998.
 16. Bleicher JN, Haynes W, Massop DW, Daneff RM. The delineation of adriamycin extravasation using fluorescence microscopy. *Plast Reconstr Surg* 1984;74:114-6.
 17. Ermiş İ, Topalan M, Erkeş NÇ, Aydın A, Görgün B. Dokso-rubisine bağlı ekstrasvazyon yaralarında "reverse" radial önköl flebi. *Acta Orthop Traumatol Turc* 1995;29:317-20.
 18. Wirtschafter JD, McLoon LK. Long-term efficacy of local doxorubicin chemomyectomy in patients with blepharospasm and hemifacial spasm. *Ophthalmology* 1998;105:342-6.
 19. Zorzato F, Salviati G, Facchinetti T, Volpe P. Doxorubicin induces calcium release from terminal cisternae of skeletal muscle. A study on isolated sarcoplasmic reticulum and chemically skinned fibers. *J Biol Chem* 1985;260:7349-55.
 20. McLoon LK, Wirtschafter J. Local injections of corticotropin releasing factor reduce doxorubicin-induced acute inflammation in the eyelid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:834-41.
 21. Nguyen LT, McLoon LK, Wirtschafter J. Doxorubicin chemomyectomy is enhanced when performed two days following bupivacaine injections: the effect coincides with the peak of muscle satellite cell division. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:203-6.
 22. McLoon LK, Luo XX, Wirtschafter J. Acute morphologic changes in orbicularis oculi muscle after doxorubicin injection into the eyelid. *Muscle Nerve* 1993;16:737-43.