

MUSCULAR DYSTROPHY'NİN ULTRASTRÜKTÜRÜ (x)

Dr. Sacide GAZİLERLİ (xx)
Dr. Birkan YAKAN (xxx)
Dr. M. Cevdet AVKAN (xxxx)

ÖZET :

Doğuştan her iki diz ve ayakda deformiteleri bulunan ve çeşitli operasyonlar geçirmiş 26 yaşındaki bir hastanın atrofik kaslarından alınan parçalarda ultrastrüktürel gözlem yapıldı.

Preparatlarımızda atrofik kas lifleri arasında hem parafin hem de yarı ince araldit kesitlerinde bol yağ dokusu izlendi. Kas liflerinden alınan ince kesitlerde elektron mikroskop ile miyofibril demetleri arasında geniş sitoplazma bölümleri görüldü. Nukleusun yer yer alışılmışın dışında miyofilaman demetleri arasında ve kas lifinin sentraline yakın lokalize olduğu izlendi. Bazı nukleusların, nukleolemalarının derin invaginasyonlarıyla, boğumlandığı ve sitoplazmada vakuoler yapılar ile sarkolemma altında yerleşik multiveziküler cisimler gözlemlendi. Gözlemlerimiz literatür verileriyle kıyaslanarak değerlendirildi.

GİRİŞ:

Musküler distrofi klasik olarak yaşa, çevre koşullarına veya genetik nedenlere bağlı olarak gelişen dejeneratif bir olgudur (6,16). Hangi nedenle olursa olsun musküler distrofide mikroskobik yapı benzer görünümündedir. Böylece kas liflerinin çapı değişiktir. Kas lifleri arasında yoğun yağ dokusu veya fibröz doku yer alır. Kas liflerinde eozinofili artar, enine çizgilenme azalır veya kaybolur, sarkoplazmada hyalinizasyon veya vakuoller görülür. Elektron mikroskobik olarak ise distrofik kasta mitokondriyonlarda anormallik veya azlık, miyofilaman kaybı, bilinen patolojik görünümlerdir. Ancak çoğu kere teşhis için sadece ışık mikroskobik gözlemlerle yetinilir veya ultrastrüktürel inceleme seyrek yapıldığı için bu konudaki veriler azdır. Biz de radyolojik, ortopedik, nörolojik, patolojik olarak ve laboratuvar verilerine göre musküler distrofi tanısı konan bir hastada ultrastrüktürel yapıyı incelemeyi amaçladık. Ayrıca hikayesinden de anlaşılacağı gibi genetik orijinli olası vakamızın nadir rastlanan bir olgu olması nedeniyle incelenmesinin yararlı olacağını düşündük.

(x) X. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresinde sunulmuştur.

(xx) Atatürk Üniv. Tıp Fak. Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi.

(xxx) Atatürk Üniv. Tıp Fak. Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı Uzmanı.

(xxxx) Atatürk Üniv. Tıp Fak. Ortopedi ve Travmatoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi.

Araştırma Hastanesi Ortopedi Kliniğine başvuran kadın hastamız 26 yaşındadır. Doğumda sol dizde genu varum, sağ dizde genu valgus, sağ ayakta talipes aquino varus, dirseklerde fleksiyon, omuzlarda abduksiyon sınırlılığı mevcuttu. 2 aylıkken her iki ayak bileğine aşıloplasti uygulanmış. Diz ve kalçayı da içine alan düzeltme alçıları yapılmış. Daha sonra 5 yıl boyunca her iki ayağındaki deformite için ortopedik bot kullanmış. 6 yaşında sol dizi için düzeltici bir operasyon (muhtemelen fraksiyonel hamstring adele uzatması) yapılmış. Yara iyileşmesinde problemler olmuş. Kontrol süresi içerisinde sol ayakta talipes equinovarus deformitesi ve kısalık gelişmiş. Hamstring adele grubunda tekrar kontraktür ortaya çıkmış. 20 yaşında sol ayakta talipes equinovarus deformitesi ve hamstring adele kontraktürü nedeniyle tekrar gevşetme ameliyatları geçirmiş. Ancak bu ameliyatlar sonunda yeterli düzeltme elde edilememiş. Bu süreçte sağ ayağında talipes equinovarus deformitesi nüksetmiş. Sol alt ekstremitte kısalığı nedeniyle sola doğru eğilerek yürüyen hastada skolyoz gelişmiş. Son 2 yıldır sol kolunda ve bacağında duyu kaybından ve uzun süreli çalışmada boynunda ağrıdan şikayetleri oluyormuş. Son olarak sağ ayak 2-3. parmaklar arasındaki yara koterize edilmiş ve deformiteleri nedeniyle FTR kliniğine nakledilmiş, FTR kliniğindeki tetkikinde kan kalsiyumunun düşük çıkması üzerine Dahiliye kliniğinde tetkik amacıyla yatırılmış. Yapılan EMG'de sol üst ve alt ekstremitte adalelerinde nörojenik tutulma olduğu rapor edilen hasta, Ortopedi kliniğine adele biyopsisi yapılması ve deformitelerin değerlendirilmesi amacıyla nakledilmiştir. 31.1.1989 tarihinde adale biyopsisi yapılmıştır.

MATERYAL VE METOD:

Tanı için incelenmeye alınan hastadan genel anestezi altında sol triseps, sol vastus lateralis ile sol gastrokinemius kaslarından biyopsi materyali alındı. Parçalar alınırken kas kontraksiyonunu engellemek için materyal iki ucundan bağlanarak çıkarıldı. Işık mikroskopik gözlem için rutin yöntemler izlenerek parafin bloklar yapıldı. Elektron mikroskopi için parçalar gluteraldehit ve osmiumla fikse edildi. Alkol dehidratasyonundan sonra araldit CY 212 ile enklüzyonlar yapıldı. Önce her blokta yan ince kesitler alınıp toluidin mavisi ile boyandı ve ışık mikroskobu ile incelendi. Böylece preparatlardaki bol yağ dokusu atılarak trim yapıldı. İnce kesitler kurşun sitrat ve uranil asetat ile boyanarak elektron mikroskopta incelendi.

BULGULAR :

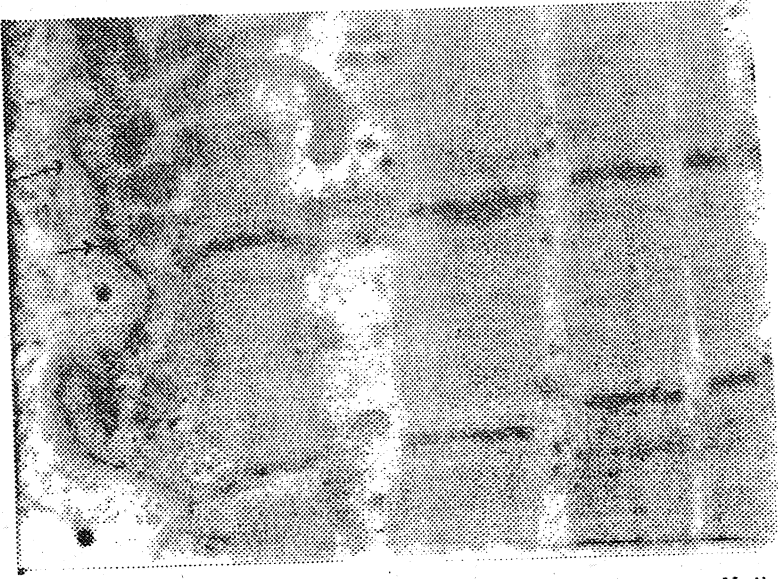
Işık mikroskobu ile hem hematoksilin-eozin ile boyanan parafin hem de toluidin mavisi ile boyanan yan ince araldit kesitlerinde bol yağ dokusu, liflerde enine çizgilenmede belirsizlik, sarkoplazmada eozinofili, santral yerleşik nükleus ve vakuoler yapılar izlendi. Bu veriler ışığında patoloji anabilim dalınca vakamıza müsküler distrofi tanısı kondu.

Ultrastrüktürel olarak incelenen her üç kasta da benzer görünümler izlendi. Böylece sarkolemma ve dışındaki glikokaliks veya bazal membran çoğu kere elektronlara karşı yoğun yapısıyla kontrast olarak belirgin görüldü. Miyofilaman

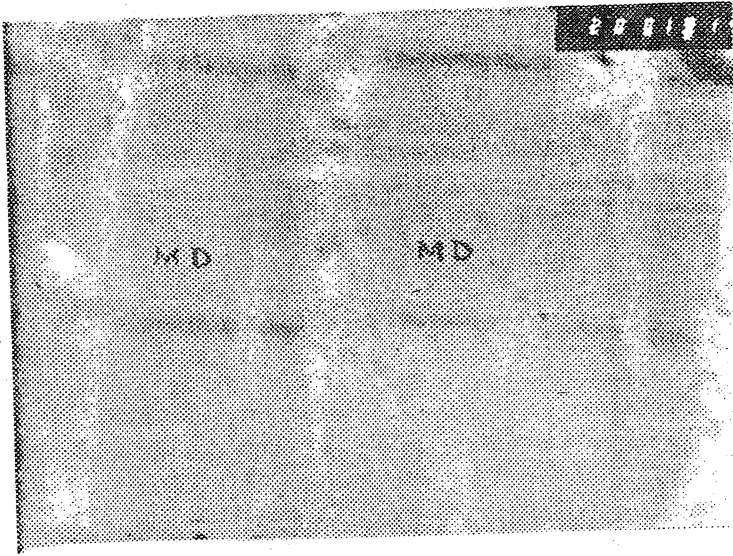
demetleri arasında mitokondriyonlar, ribozomlar, sarkoplazmik retikulum keseler izlenebiliyordu (Resim 1). Boyuna geçen kesitlerde ince sitoplazma bölümleriyle ayrılmış miyofilaman demetleri, A ve I bandları, Z diski, H diski ve M çizgisi saptanabiliyordu (Resim 1,2). Nükleus bazı kas liflerinde bilinen yeri sarkolemma altında lokalize olmuştu (Resim 3,5). Böyle nükleuslarda kromatin nükleolemma'nın altında periferde ve nükleoplazmada yer yer kaba kütleler oluşturuyordu. Çoğu kas lifinde nükleus, lokalizasyonu ve şekliyle patolojik yapıdaydı. Nükleusların çoğu nükleolemma'nın nükleoplazmaya doğru yaptığı derin invaginasyonlar nedeniyle düzensiz yapıda görüldü. Hatta bazen böyle nükleoplazma girintileri nükleusu enine bölen yapılar sergiliyordu veya nükleus içinde belirgin yuvarlak yapılar oluşturuyordu (Resim 3,4,5). Çoğu kas lifinde nükleuslar alışılmışın dışında kas lifinin sentral veya sentrale yakın bölümünde izlendi. Böyle nükleuslar periferdeki nükleuslara oranla daha az kromatin içeriyordu ve kromatin, nükleolemma altında dar bir bölümde yoğunlaştı. Ayrıca bazan bir-biri ardına yerleşik iki nükleus izlenebiliyordu. Bu nükleuslarda nükleus bedeninde seyrek dağılmış kromatin içeriğinde ancak ufak adacıklar şeklinde birkaç kromatin yoğunluğu veya seyrek olarak nükleolus seçilebiliyordu. (Resim 4,6). Ayrıca nükleusların bazılarında kromatin kitlesi veya nükleustan farklı çoğu düzgün kenarlı dörtgen yapılar şeklinde kaba granüllerin oluşturduğu cisimcikler izlendi (Resim 4).

Mitokondriyonlar kas liflerinin çoğunda yoğun matrisleri nedeniyle koyu görülen yapıdaydı. Bu yoğun matriste kristaller az belirgindi (Resim 7,10). Ancak aynı büyülmelerle bazı mitokondriyonların hacminin ileri derecede arttığı, kristallerin düzeninin bozulduğu, hatta bazı mitokondriyonlarda vakuoler görünümü yansıtan yapıların olduğu izleniyordu (Resim 8,9).

Miyofibril demetleri arasında veya nükleuslar çevresinde genişçe sitoplazma bölümlerinde daha çok serbest ribozomlar, seyrek olarak sarkoplazmik retikulum keseleri lizozomal yapılar vardı (Resim 8). Sitoplazmada yer alan miyofilaman demetleri bazı kas liflerinde sıkıca paketlenmişti ve arada sitoplazmanın diğer yapı elemanları zorlukla seçilebiliyordu. Ancak bazı liflerde miyofilaman demetleri daha ince ve seyrekti. Böyle liflerde sitoplazmanın lifler dışındaki elemanları daha bol ve belirgin izlendi. Bazı kas liflerinde ise miyofilaman demetleri arasında enine kesitlerde hemen hemen miyofilaman demeti çapına yakın lümeni olan, membranla sarılı vakuoler yapılar izlendi. Ayrıca çoğu kas lifinde ve hemen daima sarkolemma altında yerleşik iri, şekil ve yapı yönünden heterojen multiveziküler yapılar vardı (Resim 11). Bu iri yapılar içinde membranla sarılı, açık renk lümenli veziküller veya vakuoller, yine membranla sarılı ancak, lümeni daha yoğun bir materyal içeren veziküler yapılar veya ribozom ya da glikojene benzer yoğun granüller izleniyordu. Ancak miyofilaman demetleri arasındaki geniş lümenli membranla sınırlı, iri vakuoler yapıların multiveziküler cisimle komşu olduğu belirgindi (Resim 11).



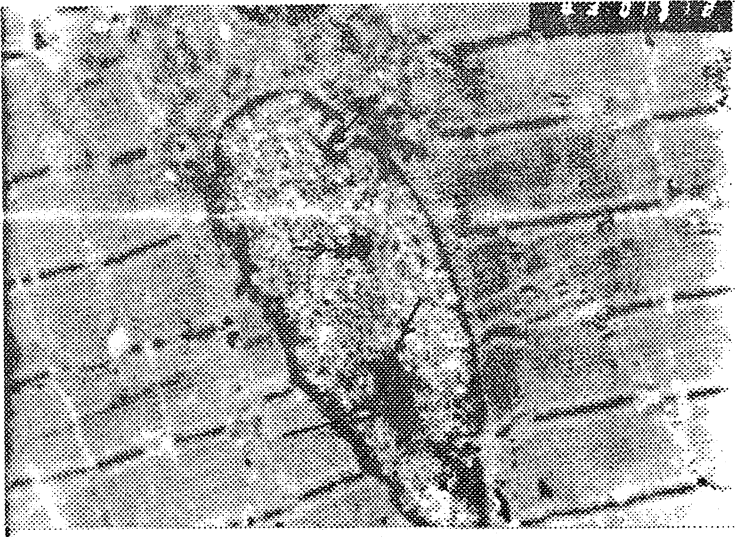
Resim 1: Distrofik kasta sarkoplazmada A ve I bandı, Z membranı ve H diski belirgin. Myofilaman demetleri ve arada mitokondriyon ve diğer hücre elemanları görülüyor. Sarkolemma (tek okla) ve bazal membran veya glikokaliks (çift okla) işaretli. X 1300.



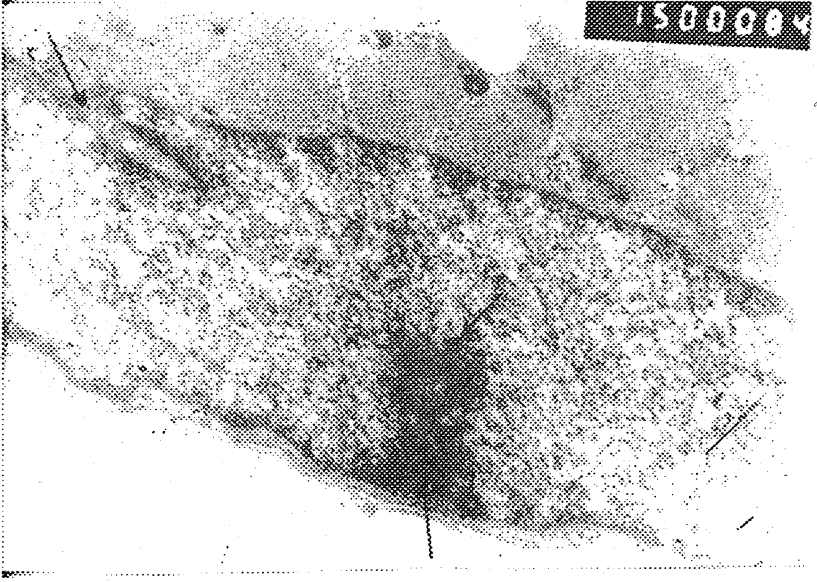
Resim 2: Boyuna geçen distrofik kas kesitinde miyofilaman demetleri (MD) ve arada sarkoplazmanın diğer elemanları görülüyor. X 2000.



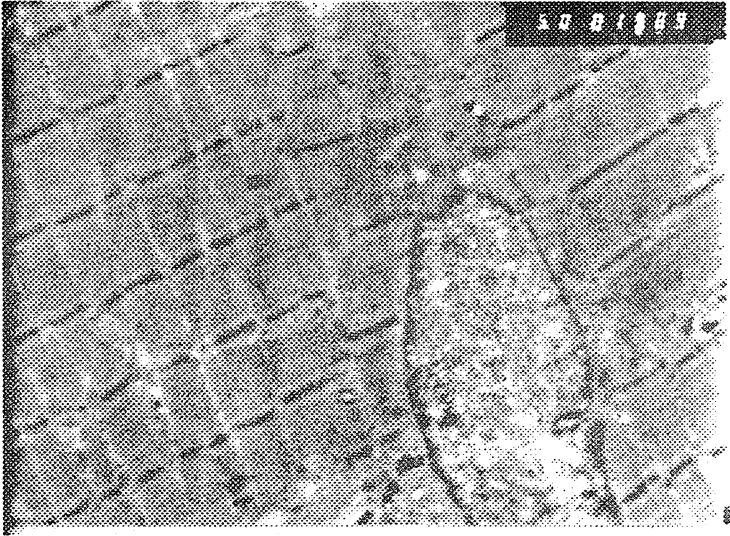
Resim 3: Distrofik kasta nukleolemma altında yerleşik nukleus. Derin nukleolemma invaginasyonları okla işaretli. X 10.000.



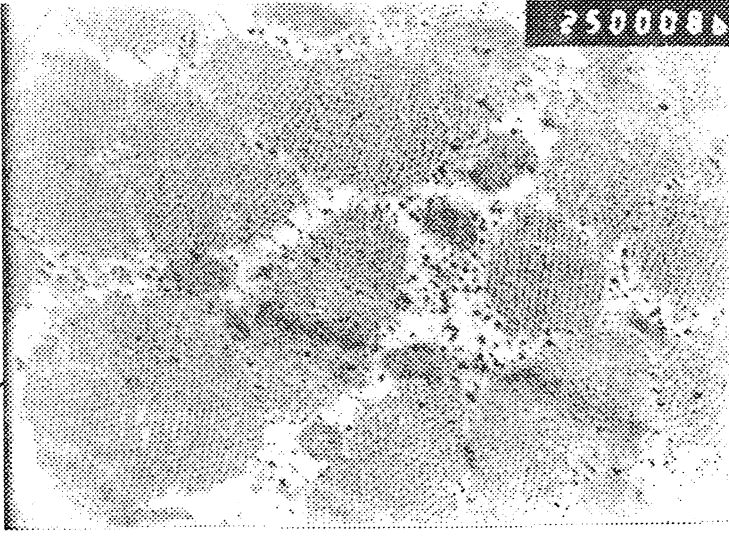
Resim 4: Lifin sentralinde yerleşik dystrofik kas nukleusu. Nukleolemma invaginasyonları (tek okla), kaba granüllerden oluşan cisimcik (çift okla) işaretli. X 8300.



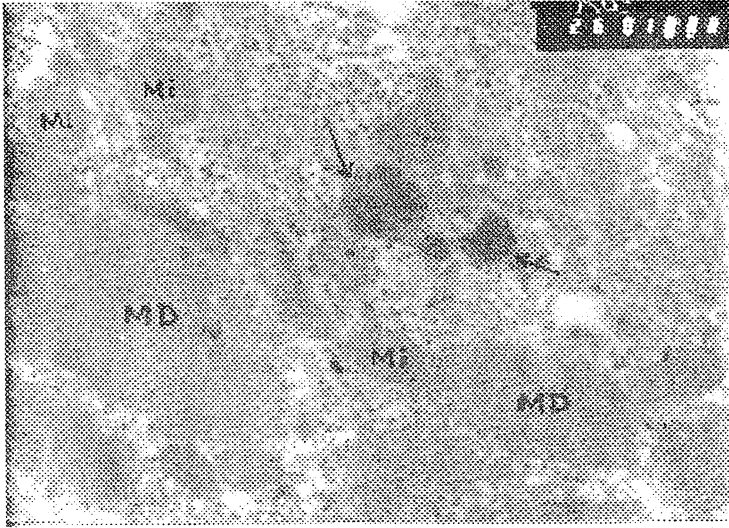
Resim 5: Distrofik kasta sarkolemma altında yerleşik nukleus.
Nukleolemma invaginasyonları (tek okla), bu invaginasyonların
enine kesiti (çift okla) işaretli. X 15000.



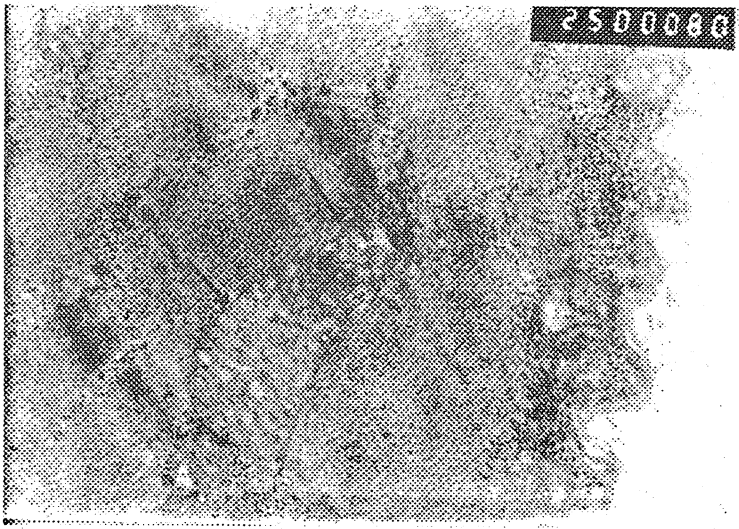
Resim 6: Distrofik kasta kas lifinin sentralinde myofilaman demetleri arasında
yerleşik nukleus. X 5000.



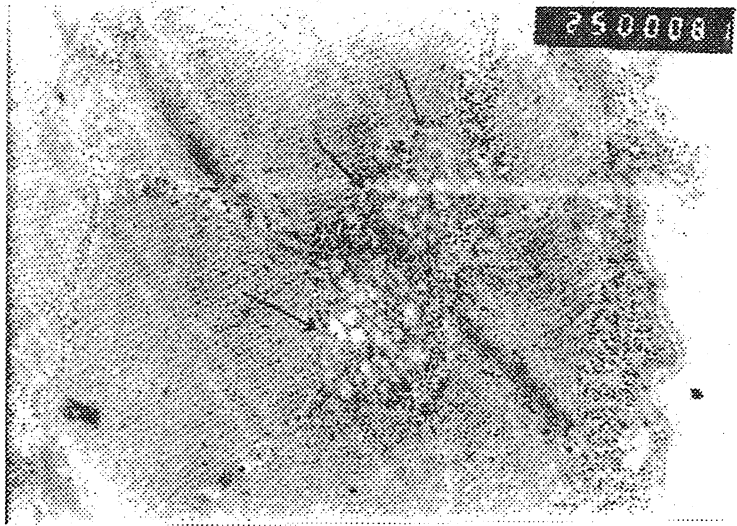
Resim 7: Distrofik kas lifinde mitokondriyonlar yoğun matriksleri nedeniyle koyu görülen yapıda ve bu yoğun matrikste kristalar az belirgin görülüyor. X 25.000.



Resim 8: Distrofik kas lifinin enine kesiti. Myofilaman demetleri (Md), mitokondriyon (Mi) ve lizozomlar (okla) işaretli. X 26.000.



Resim 9: Distrofik kasta iri ve krista düzeni bozulmuş mitokondriyonlar (okla işaretli) görülüyor. X 25.000.



Resim 10: Distrofik kasta iri ve krista düzeni bozulmuş mitokondriyonlar (okla işaretli) görülüyor. X 25.000.



Resim 11: Distrofik kasta miyofilaman demetleri arasında heterojen multiveziküler yapılar (tek okla işaretli) ve membranla sarılı vakuoler yapılar (çift okla işaretli) izleniyor. X 16.000.

TARTIŞMA :

Musküler distrofide sinirsel kontrolün bozulması veya genetik olarak X kromozomu anormal geninin protein yapısını bozması ve dolayısıyla hücre içi membran sistemleri veya plazmalemmanın yapısının bozulmasından kaynaklanan patolojik görünümüler doğar (2,4,6,8,14,16,18,21). Bunlar ışık ve elektron mikroskopik olarak kas lifi çapının değişmesi, lifler arasında bağ ve özellikle yağ dokusunun artması, sarkoplazmada myoflamanların azalması, vakuollerin görülmesi, mitokondriyonlarda dejenerasyon gelişmesi gibi görünümülerdir (1,9,10,11,14,20). Deneysel koşullarda yaratılan distrofide hızlı ve yavaş kasılan kaslarda (kırmızı ve beyaz lifler) aynı nedenle gelişen patolojik yapıların her iki tür kas lifinde de benzer görünümüler sergilediği belirtilmiştir.

Biz de bilinen bu dejeneratif yapıları elektron mikroskopik olarak preparasyonlarımızda saptadık. Ayrıca gözlemlerimizde nukleusun sarkoplazma altındaki normal yeri dışında miyofilaman demetleri arasında veya kas lifi sentralinde lokalize olduğunu gördük. Nitekim Summers ve Ashmore (1983) da nukleusun distrofik kaslarda kas lifinin santralinde lokalize olduğunu bildirmektedir (20).

Preparasyonlarımızda saptadığımız nukleus membranının derin invaginasyonlarının nukleusa loblu bir görünüm kazandıran yapıları da Law ve ark. (1983) tarafından distrofik kaslarda saptanan dejeneratif bir görünümdür (14). Nukleolemmanın bu patolojik yapısı genetik defektin musküler distrofide yarattığı, hücre-

deki membran sistemi yapı ve fonksiyon bozukluğundan kaynaklanıyor olabilir (14). Nukleusun kromatin içeriği dağılımı ve farklılığı da kanımızca dejenerasyona bağlı olmalıdır veya piknozu belirler (14). Nukleus bedeninde gözlediğimiz düzenli granüllerden oluşan düzgün kenarlı, düzenli kristaloid yapılar Law ve ark. (1983) tarafından da saptanmış ve parakristalin olarak yorumlanmıştır. Aynı araştırmacılar deneysel koşullarda yaratıkları müsküler distrofide nukleus içinde aktin benzeri flamanlar, asid fosfataz pozitif cisimcikler ve sitoplazmik organel benzeri yapılar saptamışlar ve giderek nukleusun heterojen bir kitleye dönüştüğünü görmüşlerdir (14). Bizimde hemen daima sarkolemma altında gördüğümüz iri ve heterojen vakuol ve granüllü yapılar özellikle lokalizasyonları ile böyle dejeneren nukleusları düşündürmektedir. Ancak bu yapılar kanımızca sekonder lizozomlar da olabilir. Nitekim distrofik kaslardaki bozukluk çeşitli hücre organellerini yapı ve iş yönünden birbirine bağlı olarak etkilemektedir.

Mitokondriyonlarda şişme veya yapı bozukluğu patolojik olgularda beklenen görünümlerdir. Mitokondriyon dejenerasyonu hücre ölümünün belirtisidir (17,22). Mitokondriyonlardaki yapı bozukluğu organelin fonksiyonunu, o da miyoflamanlardaki kalsiyum iyonu birikimini etkiliyor olabilir (12). Bu da Law'a (12,13) göre elektriksel eksiklikten kaynaklanır. Miyoflamanlarda kalsiyum iyonu eksikliği ise, lizozomal aktiviteyi artırır (7). Nitekim bizim preparasyonlarımızda da iri, yoğun matriksli, vakuol, vezikül ve granüllü yapılar izlendi. Kanımızca bu yapılar sekonder lizozomlar olmalı. Çeşitli araştırmacılar göstermişlerdir ki lizozomal aktivite nukleus, sarkoplazmik retikulum, T tubuli sistemi, mitokondriyon ve miyoflaman demetlerini bozar (7,19). Bu dejenerasyonlarda giderek kasta nekroz yaratır (5). Lizozomal yapılar veya nukleus dejenerasyonu bizim olgumuzda da görülmektedir.

Bazı araştırmacılar deney hayvanlarında yapay olarak yarattıkları musküler distrofiyi doğumdan veya travmadan sonra izlemiş ve distrofik kaslarla birlikte miyosatellit (rejeneratif) hücreleri belirlemişlerdir. Böylece izlenen kas rejenerasyonunu önceleri belirgin saptarken giderek yenilenme oranının düştüğünü görmüşlerdir (3,15,20). Kanımızca vakamız oldukça geç dönemde incelendiği için (26 yaş) biz, preparasyonlarımızda böyle rejenerasyonu belirleyen yapılar saptayamadık.

SUMMARY :

ULTRASTRUCTURE OF MUSCULAR DYSTROPHY

Ultrastructural observation was done on biopsies of atrophic muscles of a 26 years old patient who have had several operations for his congenital ankle and foot deformities.

Both in paraffin sections and semi-thin araldit sections, among atrophic muscle fibers an abundance of fat was observed. In muscle thin sections, large cytoplasmic parts were seen among myofibril bundles by electron microscope. It was observed that the localization of nucleus was among myofilament bundles, close to center of muscle fiber which was unusual. It was observed that nucleo-

lemma of some nucleus had invaginations. Vacuoler structures in cytoplasma and multivesiculer things under sarcolemma, also observed.

Our observations were discussed with literatures.

KAYNAKLAR :

- 1- Ashmore, C.R., Hitchcock, L., Lee, Y.B.: Passive stretch of Adult Chicken Muscle Produces a Myopathy Remarkably Similar to Hereditary Muscular Dystrophy, *Exp. Neurology*. 100: 341-353, 1988.
- 2- Banker, B.Q. A phase and electron microscopic study of dystrophic muscle. II. The pathological changes in the newborn Bar Harbor 129 dystrophic mofuse. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 27: 183-209, 1968.
- 3- Bourke, D.L., Ontell M, and Taylor, F.K: Spontaneous Regeneration of older Dystrophic Muscle Does Not Reflect Its Regenerative Capacity. *The American Journal of Anatomy*, 181: 1-11, 1988.
- 4- Bradley, W.G., Ed. (For review of the membrane hypothesis) *Muscle Nerve*. 3: 1-97, 1986.
- 5- Collan, Y., and Salmenpera, M. Electron microscopy of postmortem autolysis of rat muscle tissue. *Acta Neuropathol.* 35: 219-233, 1976.
- 6- Cotran, R.S., Kumar, V., Robbins, S.L.: Robbins Pathologic Basis of Disease. Fourth edition. W.B. Saunders Company. Harcourt Brace Jovanovich, Inc. Philadelphia-London -Toronto-Montreal-Sydney-Tokyo. 1989. p. 1368-1371.
- 7- Duncan, C.J. Role of intracellular calcium in promoting muscle damage: a strategy for controlling the dystrophic condition. *Experientia*. 34: 1531-1672, 1978.
- 8- Ellisman, M.H.: The Membrane Morphology of the Neuromuscular Junction, Sarcolemma, Sarcoplasmic Reticulum and Transverse Tubule System in Murine Muscular Dystrophy Studied by Freeze-Fracture Electron microscopy, *Brain Research*, 214 261-273, 1981.
- 9- Heffner, R.R. JR.: Electron microscopy of disorders of skeletal muscle. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 5: 338-347, 1975.
- 10- Ito, K.: Electronmicroscopic study of human dystrophic muscle. *Clin. Neurol.* 8: 685-692, 1968.
- 11- Labrecque, C., Tremblay, J.P., Fahim, M.A.: Scanning Electron Microscopic Study of the Neuromuscular Junction of Dystrophic Mice *Exp. Neurology* 100: 51-64 1988.

- 12- Law, P.K.: Leaky membrane causes weakness in dystrophic soleus fibers. *Proc. Int. Union Physiol. Sci.* 14: 542, 1980.
- 13- Law, P.K. Atwood, H.L., and Mc Comas, A.J. : Functional denervation in dystrophic mouse muscles. *Exp. Neurol.* 51: 434-443, 1976.
- 14- Law, P.K., Saito, A., Fleischer, S.: Ultrastructural Changes in Muscle and Motor End-Plate of the Dystrophic Mouse. *Exp. Neurology* 80, 361-382 1983.
- 15- Ontell, M., Feng, K.C., Klueber, K., Dunn, R.F., and Taylor, F.: Myosatellite Cells, Growth, and Regeneration in Murine Dystrophic Muscle: A Quantitative Study, *The Anatomical Record* 208: 159-174, 1984.
- 16- Rosai, J.: *Ackerman's Surgical Pathology, Volume Two. Seventh edition.* The C.V. Mosby Company. St. Louis-Toronto-Washington D.C. 1989 p. 1774-1775.
- 17- Schanne, F.A.X., Kane, A.B., Young, E.E., Farber, J.L.: Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science* 206: 700-703, 1979.
- 18- Shibuya, S., Wakayama, Y.: Freeze-fracture studies of myofiber plasma membrane in x-chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mice. *Acta Neuropathol.* 76: 179-184, 1988.
- 19- Sugita, H., Ishiura, S., Suzuki, K., and Imahori, K. : Ca-activated neutral protease and its inhibitors: in vitro effect on intact myofibrils. *Muscle Nerve* 3: 335-339, 1980.
- 20- Summers, P.J., and Ashmore, C.R.: Regeneration and Reinnervation of the Dystrophic Mouse Soleus Muscle. A Light and Electron Microscopic study. *Acta Neuropathol (Berl)* 59: 207-215, 1983.
- 21- Wakayama, Y., Kumagai, T., Jimi, T., Shibuya, S.: Freeze fracture analysis of cholesterol in muscle plasma membrane of Fukuyama-type congenital muscular dystrophy *Acta Neuropathol (Berl)*. 75: 46-50, 1987.
- 22- Wrogemann, K., and Pena, D.J.: Mitochondrial calcium overload: a general mechanism for cell-necrosis in muscle disease. *Lancet* 1: 672-673, 1976.