

**ADELE BİYOPSİLERİNİ DEĞERLENDİRMEDE KULLANILAN
HİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER VE DEĞİŞİK ŞİDDETE
EGZERSİZLERE BAĞLI OLARAK GELİŞTİRİLMİŞ ADELE
HİPERTROFİLERİ ÜZERİNE DENEYSEL BİR ÇALIŞMA***

Bedri KANDEMİR**

Ö Z E T :

Eşit sayıda üç gruba ayrılmış 60 Swiss - albino cinsi erkek sıçan üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmada bir yandan adele biyopsilerini değerlendirilmede kullanılan histokimyasal tekniklerin karşılaştırılması yapılırken diğer yandan değişik şiddetteki egzersizlere bağlı olarak gelişen adele hipertrofilerinin değerlendirilmesi yapılmıştır.

Sonuç olarak;

1. Adelenin morfolojik yapısını ortaya çıkarmada Gomorinin trikrom boyaması ile, lif tipi ayırımında da Myosin ATP ase aktivitesini göstermek için kullanılan kalsiyum tekniğiyle en iyi sonuçlar alınmıştır.

2. Myosin ATP ase reaksiyonlarında tip - II liflerdeki tip II A ve tip - II B ayırımının tip - I liflerde de (tip - I A ve tip - I B) mevcut olduğu görülmüştür.

3. Değişik şiddetteki egzersizler, fizyolojik sınırlarda kalındığında, adele lifleride sadece hacim büyümelerine, aşırı zorlamayla bu sınır aşıldığında hacim büyümesinin yanı sıra lif yıkımına da neden olmuştur.

S U M M A R Y :

An experimental study on histochemical methods used in evaluation of muscle biopsies and muscles hypertrophy after exercise of varying intensity.

(*) Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı ve Cerrahi Araştırma Ünitelerinde yapılmıştır.

(**) Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi.

This study has been carried out on 60 Swiss - albino rats equally divided into 3 groups. The purpose was to compare the histochemical techniques used in evaluation of muscle biopsies and to show the histological changes in skeletal muscle hypertrophy after exercise of varying intensity.

It is concluded that;

1. Gomori's trichrome staining technique proved to be superior to other methods used to demonstrate the morphological structure of skeletal muscle and the best result were obtained by calcium method for myosin ATP ase activity in fiber type identification.
2. Two subtype of type - I fibers were demonstrated as were in type - II fibers.
3. Physiological exercise caused an increase in muscle fibre volume but heavy exercise caused fiber destruction in addition to volume increase.

İnsan sağlığının geliştirilerek korunmasında ve bazı hastalıkların rehabilitasyonunda sportif faaliyetlerin değeri giderek daha açık bir şekilde anlaşılmakta ve spor yapma eğilimi geniş kitleler arasında süratle yayılmaktadır.

Yararlı beklentilerle yapılan sportif faaliyetlerin hareket sisteminin yanı sıra organizmayı tümüyle etkilediği bilinmektedir. Gelişen spor hekimliği sayesinde dozu iyi ayarlanmayan ve şahsın özel yapısına uygun olmayan spor programlarının ciddi zararlı etkilerinde geliştiği tartışmasız bir şekilde ortaya konmuştur (14). Yapılan klinik ve deneysel araştırmaların ortaya koyduğu bulgularla ve yapılacak olanlarında bu konudaki açık noktaları kapatmasıyla şahsın özelliklerine uygun ve zararlı etkilerden uzak spor ve rehabilitasyon programlarının geliştirilmesi mümkün olacaktır.

Sportif faaliyetler etkilerini ilk önce ve en güçlü bir şekilde adele doku üzerinde göstermektedirler. Gönüllü sporcular ve hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda adele kitlelerinde belirgin hacim ve ağırlık artışının yanısıra, ağır spor yapanlarda, yıkımaya ait belirtilerinde ortaya çıktığı gösterilmiştir (1, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 13).

Adele kitlelerindeki bu artışta lif hacimlerindeki büyümenin, lif sayısının artmasının veya her ikisinin birden etken olabileceği öne sürülmüş ancak bu konu ve ağır egzersizler sonucu adele liflerinde meydana gelen uzunlamasına ayrılmalar ve yan dallanmaların neyin göstergesi olduğu konusu henüz açıklığa kavuşturulamamıştır (11, 13).

İster egzersizlere ister başka bir nedene bağlı olarak gelişmiş olsun adele dokusundaki değişiklikleri doğru bir şekilde gözleyebilmek için dokunun alınımında ve incelenmesinde uygulanacak olan işlemlere aşırı dikkat gösterilmesi ve yöntemlerin gayeye uygun olarak seçilmesi gerekmektedir (12).

Patoloji uygulama alanında kullanılan yöntemlerin zamanla daha modern ve tatminkar yöntemlere doğru geliştiği ve klasik yöntemlerin hastalıkların tanımlanmasında ve yeni hastalıkların ortaya çıkarılmasında yetersiz kaldığı artık bilinen bir gerçektir (5, 12). Çok ileri devrelere ulaşmayan adele hastalıklarında klasik yöntemler uygulandığında patolojik olaylar ortaya çıkarılmamakta ve doku normal olarak rapore edilebilmektedir. İşlemlerin uygulanmasında dikkatsiz davranılması sonucu meydana gelebilecek yapay değişiklikler bunun tam aksi bir durumu ortaya koyabilmektedir (5).

Klasik yöntemlerin yetersizliğinin anlaşılmasından sonraki son 25 sene içerisinde adelenin histokimyasal özelliklerini ortaya çıkarmak ve bu özelliklerin değişik hastalıklarda ne gibi bir davranış gösterdiklerini açıklayabilmek amacıyla yeni birçok yöntem geliştirilerek uygulama alanına konmuştur (5, 12). Bunlardan özellikle elektron mikroskobu ve elektron mikroskobu ile kombine edilmiş histokimyasal yöntemler son derece güvenilir sonuçlar vererek ileride adele biyopsilerinin değerlendirilmesinde kullanılacak zorunlu yöntemler olduklarını kanıtlamışlardır (12).

Bu gelişmiş yöntemlerle yapılan çalışmalarda insan ve hayvanlardaki iskelet kaslarının tip - I ve tip - II olmak üzere iki lif tipinden oluştukları ve özellikle hayvanlarda tip - II liflerin tip II A ve tip - II B olmak üzere iki alt guruba ayrıldıkları kesin olarak gösterilmiştir (5, 7, 9, 10, 12). Tip - II B lifler myosin ATP ase

reaksiyonlarında, alkalen ortamda, tip - II A liflerden daha koyu, asit ortamda daha açık renge boyanırlar ve intermediyer lifler olarakta bilinirler (5, 12).

Tip - I lifler myosin ATP ase, phosphorilase ve glikojenden fakir ve NADH tetrazolium resductase (diaphorase), mitokondrial oksidatif enzimler (succinate dehydrogenase gibi) ve myoglobulinden zengin bir yapıya sahiptirler. Tip - II lifler tip - I lerin bu karakterlerinin tersini gösterirler (5, 8, 9, 10, 12).

Tip - I lifler fazla miktarda myoglobülin içerip kırmızı görüntü verdiklerinden «Kırmızı lifler» ve yavaş kasıldıklarından dolayı «Slowtwitch lifler» isimlerininide alırken tip - II lifler az myoglobülin içerip beyaz görüntü verdiklerinden «Beyaz lifler» ve çabuk kasıldıklarından «Fast - twitch lifler» isimlerini alırlar (8, 10).

Bir adele dokusunda meydana gelen değişiklikleri doğru olarak değerlendirebilmek için yapay değişikliklere meydan vermeden yukarda sözü edilen karakterleri ortaya koymak ve bunlarüa meydana gelebilecek normalden sapmaları doğru olarak değerlendirmek gerekir.

Biz bu çalışmamızda bir yandan değişik şiddetteki sportif faaliyetlerin adele dokusu üzerindeki etkilerini incelerken diğer yandan adele biyopsilerinin değerlendirilmesinde kullanılan histokimyasal yöntemlerin patolojik olayları ortaya koymadaki başarılarını ve ülkemiz şartlarında uygulanabilirliğini ortaya koymaya çalıştık.

MATERYEL ve METOD :

Bu çalışmada 60 adet Swiss - albino cinsi, 250 - 300 gr arasında ağırlıkları olan 6 aylık erkek sıçanlar deney hayvanı olarak kullanılmıştır. Bu sıçanlardan 20 tanesi doğup büyüdükleri kafesler içerisinde, hiçbir işleme tabi tutulmadan kontrol gurubu olarak konurken 20 sıçanlık ikinci gurup 25 m² genişliğinde bir oda içerisinde yerleştirilerek 3 hafta süreyle, sabahları saat 8 - 11 arasında akşamları 14 - 17 arasında olmak üzere günde toplam 6 saat süreyle, yüksek gürültü ile uyarılarak, koşturuldular.

20 hayvanlık üçüncü guruptaki sıçanlara ağır egzersiz yaptırma yolunu bulamadığımızdan bu hayvanların bazı adelelerinin sinerjistlerini, bir kısmında buna ilave olarak kitlelerinin yarısını da, çıkararak bu adelerin iş yüklerini aşırı bir şekilde artırmayı planladık. Bunun için hayvanları 30 mgr/kg nembütal ile uyuttuktan sonra incelemeyi düşündüğümüz *M. triceps brachii*, *M. flexor carpi ulnaris*, *M. rectus femoris* ve *M. tibialis anterior* adelerinin üzerine gelen deri kısımlarını traş ettikten ve bölgeyi mersol ile temizledikten sonra ekstremitelerin uzun eksenlerine paralel şaklarla bu adelere ulaştık. Daha sonra bu dört adelenin tüm sinerjistlerini kemiğe tutundukları bölgelerden ve her iki uçlarından, kanama kontrolü yaparak, disseke edip çıkardık. Buna ilave olarakta *M. triceps brachii*'nin lateral ve medial başlarını uzun bacağına zarar vermeden ve *M. Rectus femoris*ide uzunlamasına ortadan ikiye ayırarak, diğer yarısına zarar vermeden, bir yarısını çıkardık. Kanama konröllerini tekrar yaptık, deriyi diktik ve yara alanlarını mersol ile yeniden temizleyerek cerrahi işleme son verdik. Bu hayvanlar yara iyileşmesini sağlamak amacı ile 24 saat süreyle ayrı kafeslerde tutulduktan sonra ikinci gurup hayvanlarda olduğu gibi 25 m² genişliğinde odalara yerleştirilerek yüksek gürültünün etkisi altında günde 6 saat süreyle koşturuldular.

Birinci guruptaki hayvanlar kafesler içerisinde kendi hallerinde, ikinci ve üçüncü guruptaki hayvanlarda spor yaptıkları odalarda 3 er hafta süreyle tutulduktan sonra kapaklı, geniş kavanozlar içerisinde yerleştirilerek eter verilmek suretiyle öldürüldüler.

Kontrol ve deney guruplarındaki sıçanların tümünün *M. triceps brachii*, *M. flexor carpi ulnaris*, *M. rectu femoris* ve *M. tibialis anterior* adeleri, yapay değişikliklere yol açmamak için, gerekli dikkat gösterilerek kemiklere tutundukları alanlardan ve etraf dokulardan sıyrılarak çıkardılar ve serum fizyolojik içerisinde 5 dakika süreyle tutuldular. Daha sonra adele kitleleri ortalarından uzunlamasına ikiye ayrıldılar. Bu örneklerin birinci yarıları % 20 lik nitrik asit içerisinde 24 saat süreyle bekletildi. Bu sürenin sonunda doku örnekleri tekrar serum fizyolojik içerisine konarak ince uçlu bir iğnenin yardımıyla bağ dokusu elemanlarından kurtarılarak yine serum fizyolojik içerisinde magnetik karıştırıcının

üzerine yerleştirildiler. Burada oluşturulan şiddetli su akımının yardımıyla adele lifleri tek tek birbirinden ayrıldılar. Son işlem olarak bu lifler bir lam üzerine konup gliserin jeli damlatılarak lamelle kapatıldılar ve lif yapılarını gözlemek üzere faz - kontrast mikroskop altında incelendiler. Lif ayırımında kullandığımız bu yöntem Reitsmanın kullandığı yöntemin su akımı oluşturma kısmının değiştirilmiş şeklidir (13).

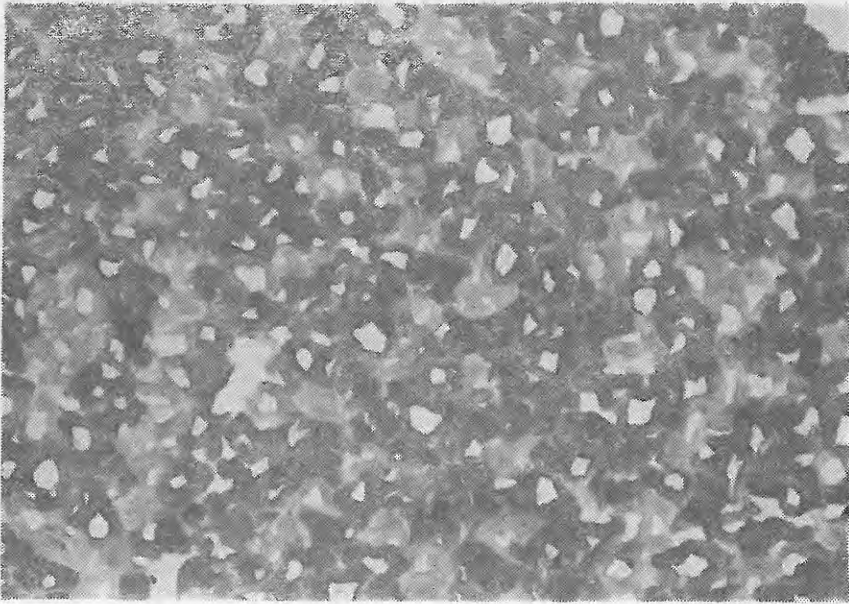
Örneklerin ikinci yarılarının orta kısımlarından enlemesine, 0,3 cm kalınlığında, iki dilim çıkarılarak bir tanesi bir sanayi kuruluşundan temin edebildiğimiz sınırlı miktardaki sıvı nitrojen içerisinde şok tarzında, diğeri de karbondioksit karı içerisinde mümkün olduğu kadarıyla, süratli bir şekilde dondurularak frozınsekşin aletine yerleştirildiler. Burada hazırlanan 10 mikron kalınlığındaki seri kesitler Hematoksilin ve eozin, Gomorinin trikrom tekniği, Van - Gieson tekniği, myosin ATP ase aktivitesi için kalsiyum tekniği, NADH diaphorase, phosphorilase aktiviteleri için MTT teknikleri ve glikojen içinde PAS tekniği ile boyandılar (2, 5). Frozından artakalan materyaller rütin takipten geçirilerek parafinde bloklandılar. Bu bloklardan hazırlanan 7 mikron kalınlığındaki kesitlere yukarıda belirtilen ve enzim reaksiyonlarının dışında kalan tekniklerin tümü uygulandı. Daha sonra hazırlanan preparatların tamamı ışık mikroskobu altında incelenerek değerlendirildiler.

B U L G U L A R :

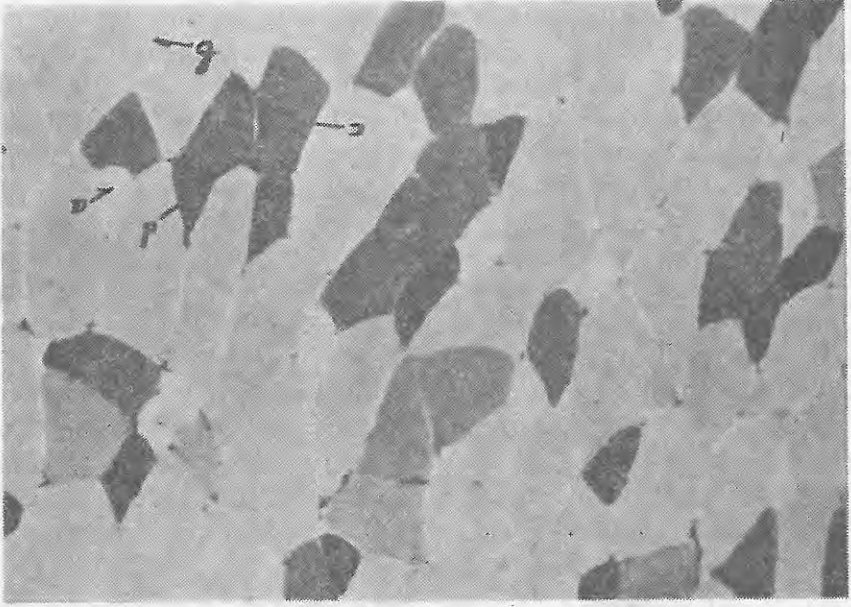
Kontrol ve deney guruplarındaki hayvanların genel durum ve davranışları tüm deney süresince izlendi. Kontrol gurubundaki hayvanlarda herhangi bir değişiklik gözlenmezken birinci deney gurubundaki hayvanlarda fiziki yapının giderek geliştiği ve fiziki aktivitenin ileri derecede arttığı izlendi. İkinci deney gurubundaki cerrahi işlem görmüş hayvanların ilk günde ancak ön ve arka bacaklarını sürüyerek yürüyebildikleri, ikinci günde güçlkle de olsa ayağa kalkabildikleri, üçüncü günde normal yürüyebildikleri ve daha sonraki günlerde birinci deney gurubundaki hayvanlar gibi koşabildikleri gözlemlendi. Hiçbir sıçanda yara enfeksiyonu meydana gelmedi.

Son defa spor yaptırıldıktan hemen sonra öldürülen hayvanlardan alınan doku örneklerinin incelenmesine kontrol gurubundan başlandı. Bundan amacımız kullandığımız yöntemlerin adele dokusunun histolojik ve histokimyasal yapısını ortaya koymadaki başarılarını karşılaştırmak ve deney gurupları materyalini burdan elde edilecek bulguların ışığında değerlendirmektir.

Karbondioksit karında dondurularak frozında kesilen preparatlarda, yavaş donmaya bağlı olarak gelişen buz kristallerinin adele liflerinin merkezlerinde geniş boşalmalara yol açarak dokuyu değerlendirilemeyecek derecede bozduğunu gördük (Resim : 1). Krbondioksit karının çok süratli ve bol miktarda uygulandığı örneklerde buz kristalleri yine mevcuttu ancak çapları daha küçük ve doku yıkımı daha azdı. Sıvı nitrojen ile dondurulan doku örneklerinin hiç birisinde buz kristalleri oluşmadı ve dokunun normal histolojik görünümünü tüm ayrıntıları ile ortaya çıkarılabildi (Resim : 2).



Resim 1 : Karbondioksit karyile dondurulup frozın - sekşin aletinde kesilmiş preparattan hazırlanan bu resimde, adele liflerinin merkezinde oluşan buz kristallerinin dokunun normal yapısını değerlendirmeye imkan vermeyecek şekilde bozduğu görülmektedir. (Myosin ATP ase x 300).



Resim 2 : Sıvı nitrojende şok tarzında dondurularak frozın - sekşin aletinde kesilmiş preparattan hazırlanan bu resimde dokunun yapısının tam korunduğu ve tip - II liflerde olduğu gibi tip - I liflerinde iki alt guruba ayrıldığı görülmektedir (a - tip - IA, b - tip - IB, c - tip IIA, d - tip IIB). (Myosin ATP ase x 300).

Frozın ve parafin kesitlerine uygulanan Hematoksilen ve eozin boyamalarında adele kitlelerinin histolojik yapısı oldukça iyi bir şekilde ortaya çıkarıldı. Ancak aradoku elemanlarının tüm ayrıntıları ile ortaya çıkarılmasında istenilen derecede bir başarıya ulaşamadığı gibi lif ayırımını yapmakta mümkün olmadı.

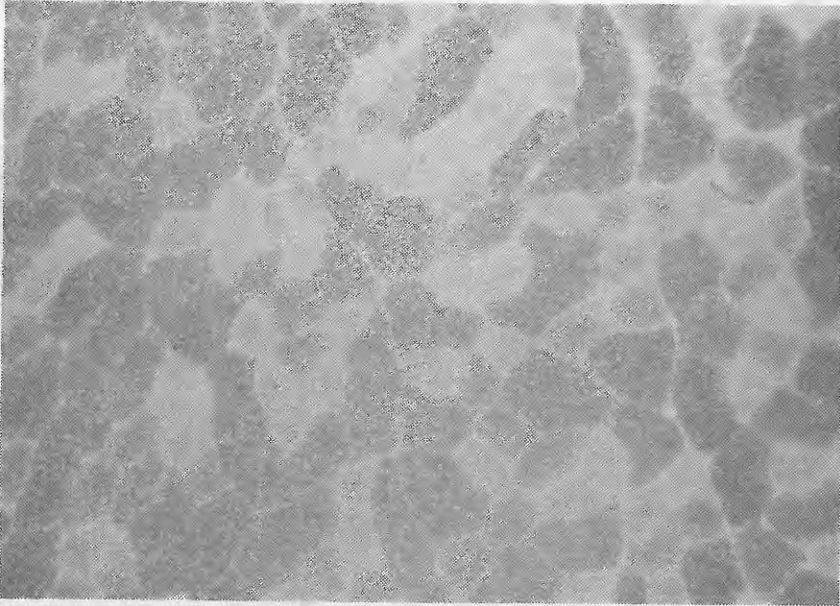
Yine frozın ve parafin kesitlerine uyguladığımız Gomorinin trikrom boyama takniğinde adele morfolojisi ve adele dokusunun aradoku elemanları ile ilişkisini göstermedeki başarı mükemmeldi. Yüksek derecedeki büyütmelede yapılan incelemede tip - I liflerinin içerisindeki myofibrillerin daha koyu yeşile boyanması ile lif tipi ayırımı mümkün olduysada bu yöntemin bu gayeye fazla uygun olmadığı izlenimi alındı.

Van Gieson boyamalarında adele dokusunun parlak sarıya ara doku elemanlarında parlak kırmızıya boyanarak birbirinden kolayca ayrılabilirdi ve bu elemanların birbiri ile ilişkilerinin açık

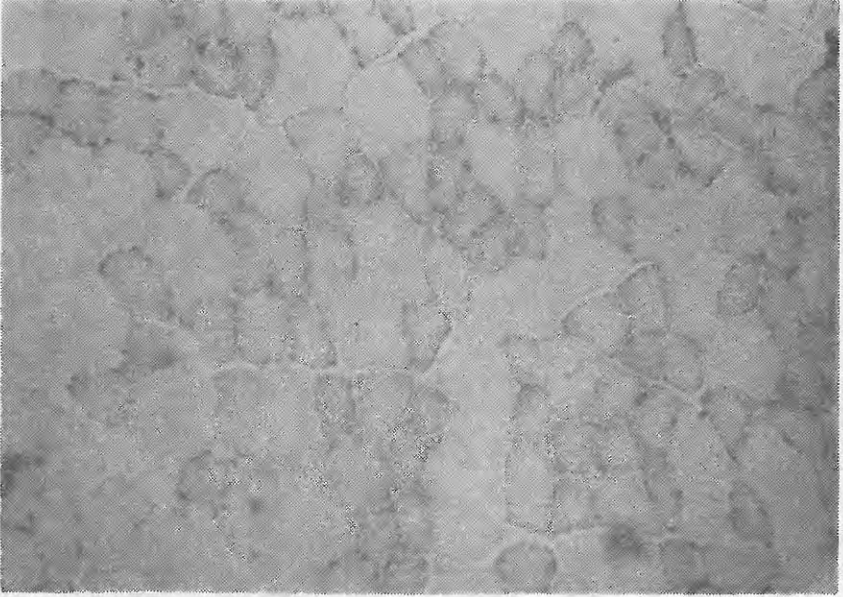
bir şekilde görülebildiği izlendi fakat dokunun ince yapısını ve lif tipi ayırımını ortaya koymada başarılı olunamadı.

Glikojen için uyguladığımız PAS yönteminde, her iki tip lifin içerdiği glikojen miktarının farklı olması nedeniyle lif tipi ayırımı kolayca yapılabilir.

Frozun kesitlerine uygulanan myosin ATP ase, phosphorilase ve NADH diaphorase yöntemleri ile hazırlanan preparatlarda istenilen gayeye uygun olarak lif tipleri ayırımının yapılmasında en başarılı sonuç myosin ATP ase yönteminde alındı (Resim 2). Phosphorilase reaksiyonlarında tip - I, tip II A ve tip - II B lifler, myosin ATP ase yöntemindeki kadar belirgin olmasa da, ayrılabilmekteydi (Resim 3). NADH diaphorase reaksiyonlarında sadece tip - I ve tip - II ayırımı yapılabilir. Tip - IIA ve tip - IIB leri birbirinden ayırd etmek mümkün olmadı (Resim 4).



Resim 3 : Sıvı nitrojende şok tarzında dondurularak phosphorilase reaksiyonu uygulanmış bu kesitte myosin ATP ase reaksiyonundaki kadar olmasada, tip - II liflerin iki alt guruba ayrıldıkları seçilebilmekte ancak tip - I liflerin bu özellikleri gözlenememektedir (tip - I : açık renk tip - II A açık gri renk, tip - II B koyu gri renk). (Phosphorilase x 300).



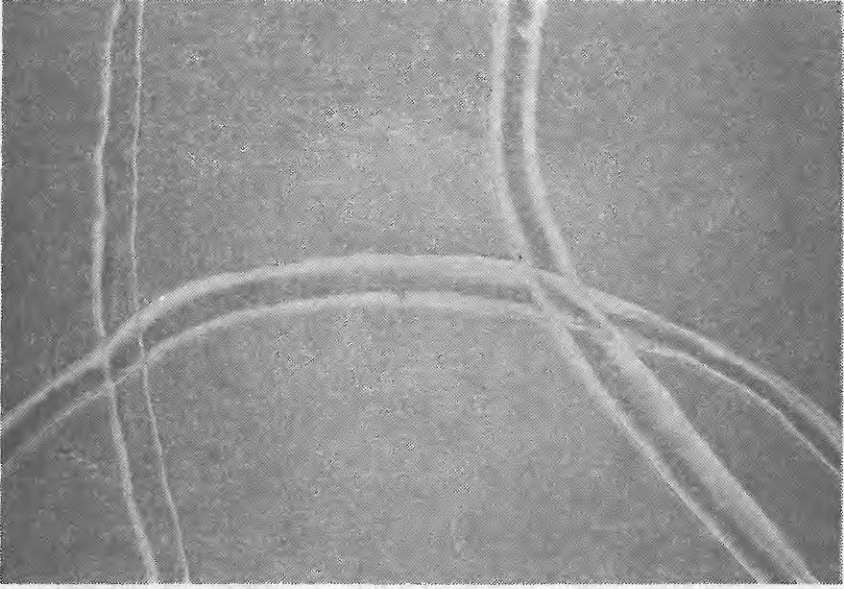
Resim 4 : NADH diaphorase yöntemi uygulanmış bu kesitte tip - I ve tip - II liflerin ayırd edilebildiği ancak alt gurupların seçilemediği görülmektedir (NADH diaphorase x 300).

Asit disseksiyon yöntemiyle hazırladığımız preparatların Faz-kontras yöntemiyle incelenmesinde bağ dokusu elemanlarından tümüyle sıyrılmış ve birbirinden tamamen ayrılmış lifleri bütünüyle ve tüm ayrıntılarıyla gözlemek mümkün oldu (Resim 5).

Kontrol gurubu materyaline yukarıdaki yöntemleri uygulayarak elde ettiğimiz sonuçlar lif tipi ayrımındaki farklılığın dışında giriş kısmında belirttiğimiz özellikleri taşımaktaydı.

Özellikle myosin ATP ase reaksiyonlarıyla çalıştığımız preparatlarda tip - I liflerinde, aynen tip - II liflerde olduğu gibi, bir kısmının hiç reaksiyon vermeyerek renksiz kaldıkları, diğer bir kısmında çok hafif reaksiyon vererek açık gri renkte boyandıkları ve böylece iki ayrı alt guruba ayrıldıkları izlendi (Resim 2).

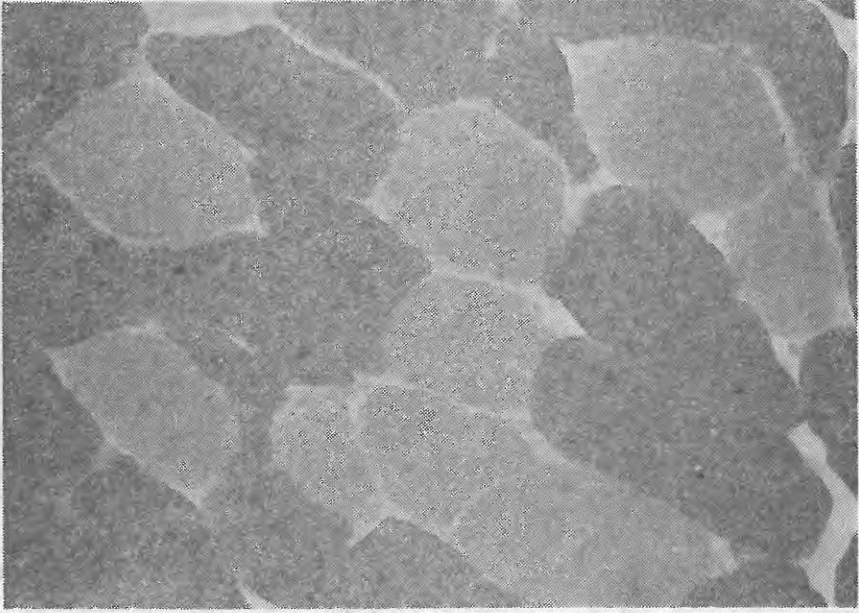
Fizyolojik şartlarda spor yaptırdığımız guruptaki sıçanların, materyel kısmında belirttiğimiz, dört adelesinden hazırlanan kesitlerde kontrol gurubundan farklı olarak adele liflerinin çapları



Resim 5: Nitrik asit disseksiyonu yöntemiyle hazırlanmış bu kesitte adele liflerinin normal yapısı görülmektedir (Phase - contrast x 20).

nın büyüdüğü ve sabit alan ölçüsü olarak kullandığımız x650 büyütmedeki bir fotoğraf dikdörtgenine sığan lif sayısının azaldığı görüldü. Ayrıca myosin ATP ase reaksiyonlarında tip - I ve tip - II liflerin kendi aralarında ikiye ayrıldıkları ve tip - I liflerin en açık boyanan guruba, tip - II liflerinde tip - IIB gurubuna kaydığı dikkatimizi çekti. Lif yıkımına ait bulgu mevcut değildi ve nitrik asit disseksiyonu ile hazırlanan lif preparatlarında normal yapı izlendi.

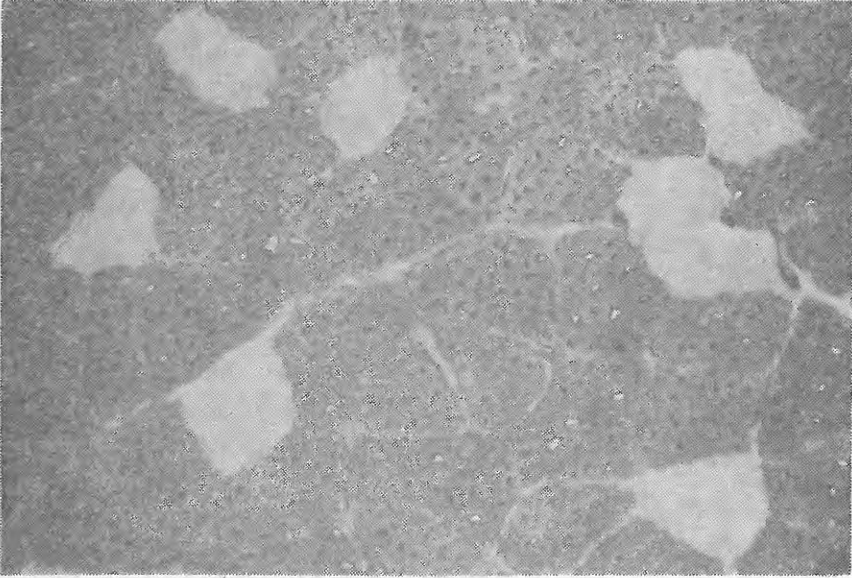
Cerrahi işlemle adelerinin iş yükleri ileri derecede artırılmış, ikinci deney gurubundaki, sıçanlardan elde edilen materyelin incelenmesinde tüm adele liflerinin çaplarının ileri derecede büyüdüğü, tip - I tip - II lifler arasındaki büyüklük farkının kaybolduğu ve kontrol gurubunun aksine, birinci deney gurubunda olduğu gibi, tip - I ve tip - II liflerin kendi içlerinde alt guruplara ayrıldıkları izlendi (Resim 6). Deney materyeli olarak kullandığımız dört adelenin her birisinde lif kompozisyonu, diğer guruplardada olduğu gibi, aynı hayvanda adeleden adeleye, aynı adede-



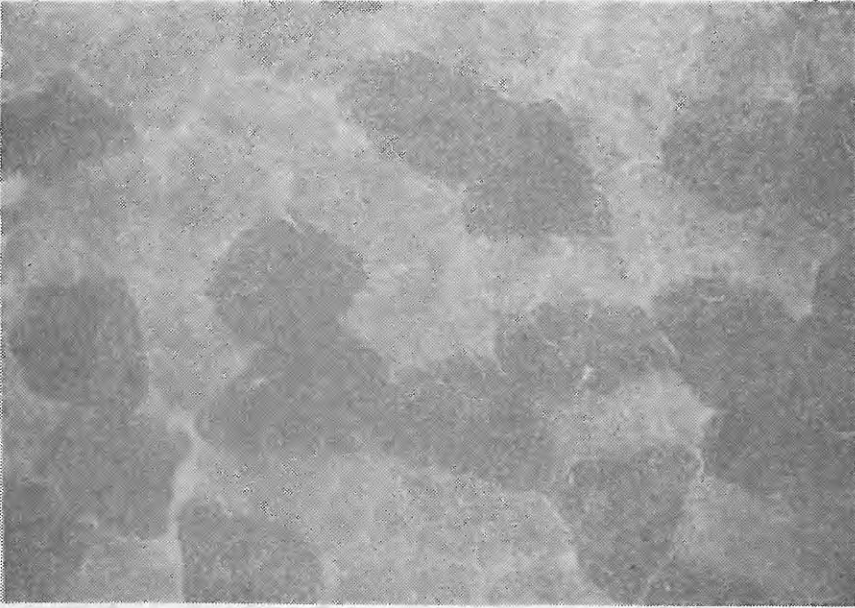
Resim 6 : Ağır egzersiz yaptırılmış sıçanlara ait bu kesitte tip - I ve tip - II liflerin aralarındaki büyüklük farkının kaybolduğu ve lif tiplerinin alt guruplara ayrılmadıkları görülmektedir. (Myosin ATP ase x 650)

de hayvandan hayvana ve aynı adelede bölgeden bölgeye değişmekteydi. *M.triceps brchii*'nin iki ayrı alanından myosin ATP ase reaksiyonu ile hazırlanan preparatlardan birinde tip - I diğerinde tip - II liflerin görüntüye hakim olması bunun güzel bir örneğiydi (Resim 7 ve 8).

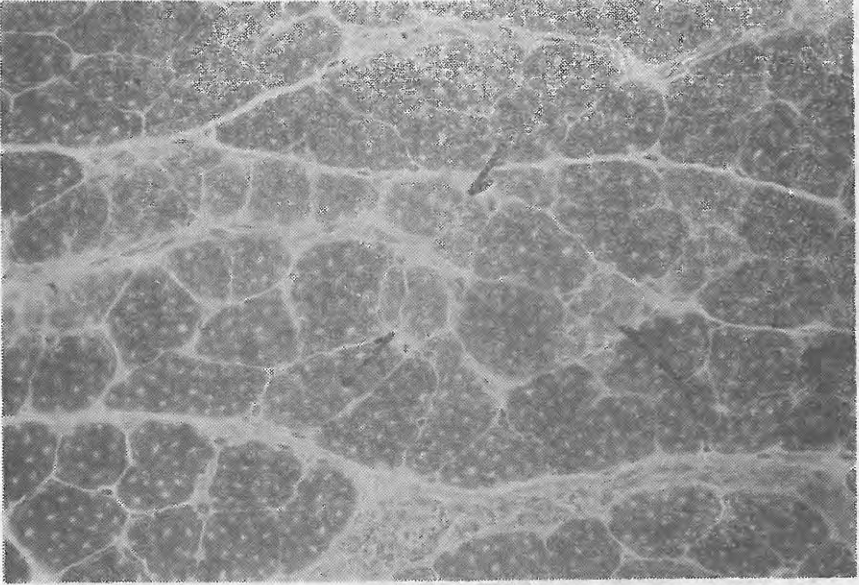
Bu guruptaki hayvanlara ait kesitlerin tamamında ileri derecede hipertrofiye olmuş adele lifi kümeleri arasında bazı liflerin yada birkaç liflik küçük gurupların nekrobiotik değişiklikler gösterdiğini ve bu liflerin hemen tamamında bölünmelerin meydana geldiğini gördük (Resim 9 ve 10). Sinerjistleri ile birlikte kendi kitlelerinde bir kısmı çıkarılan *M. triceps brachii* ve *M. rectus femoris* adalelerinde bu tip değişiklikler daha yaygın ve daha şiddetliydi. Yıkıma doğru giden adele liflerinin çapı diğerlerinden çok daha küçüktü ve etraflarında lifleri tek tek saran, damarsal yapılardan aşırı zengin bağ dokusu gelişmişti (Resim 11). Bağ dokusu



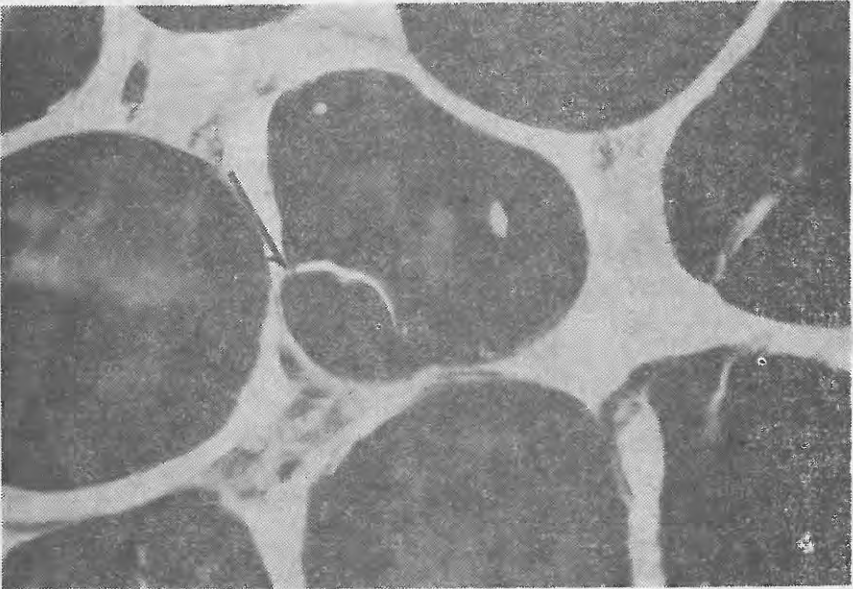
Resim 7 : *M. triceps brachii*'nin bir alanından hazırlanmış bu kesitte tip - II liflerin görüntüye hakim olduğu izlenmektedir (Myosin ATP ase x 650).



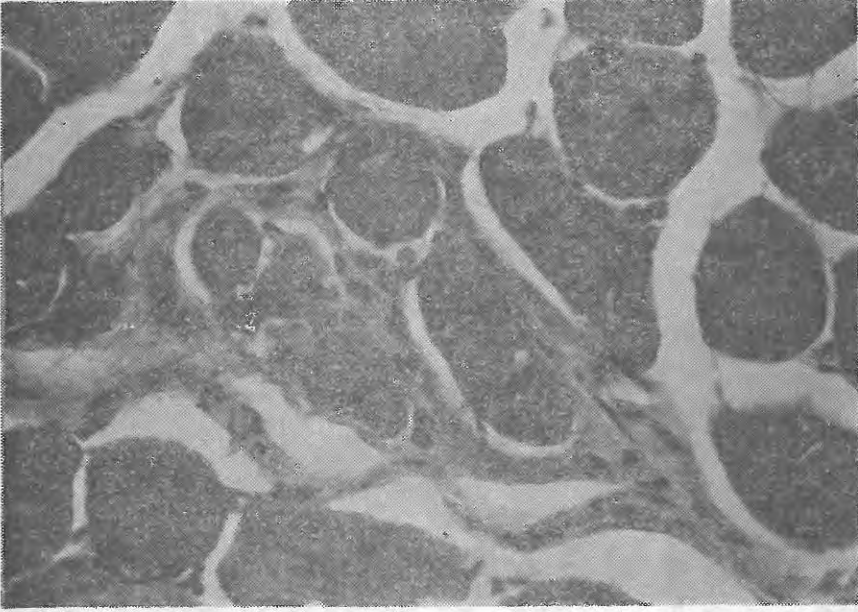
Resim 8 : *M. triceps brachii* nin bir başka alanından hazırlanmış bu kesitte tip - I liflerin tip - II lere oranla daha geniş alan işgal ettiği görülmektedir (Myosin ATP ase x 650).



Resim 9 : Ağır egzersiz yapmış bu sıçan adelesinde hipertrofiye lif gurupları arasında yer alan dejenere liflerde ayrılmalar görülmektedir. (Gomori's trichrome x 300).



Resim 10 : Resim 9 un büyütülmüş bir alanından hazırlanan bu resimde merkezde yer alan dejenere adele lifinin myofibrillerini kaybettiği ve ayrılma gösterdiği izlenmektedir (Gomori's trichrome x 850).

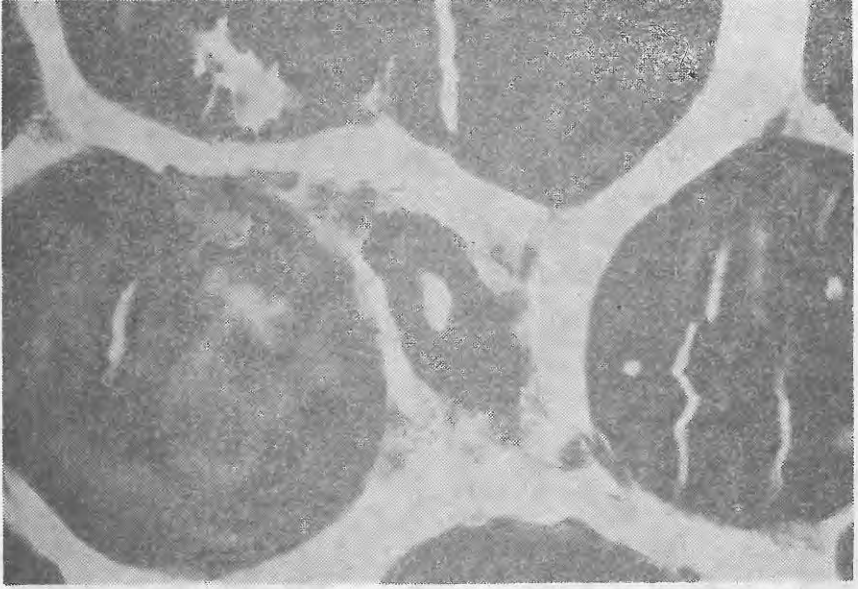


Resim 11 : Ağır egzersiz yapmış gurup sıçanlara ait bu kesitte de yıkım belirtileri gösteren lifler çevresinde damarsal yapılardan zengin yoğun bağ dokusu gelişimi izlenmektedir (Comori's trichrome x 650).

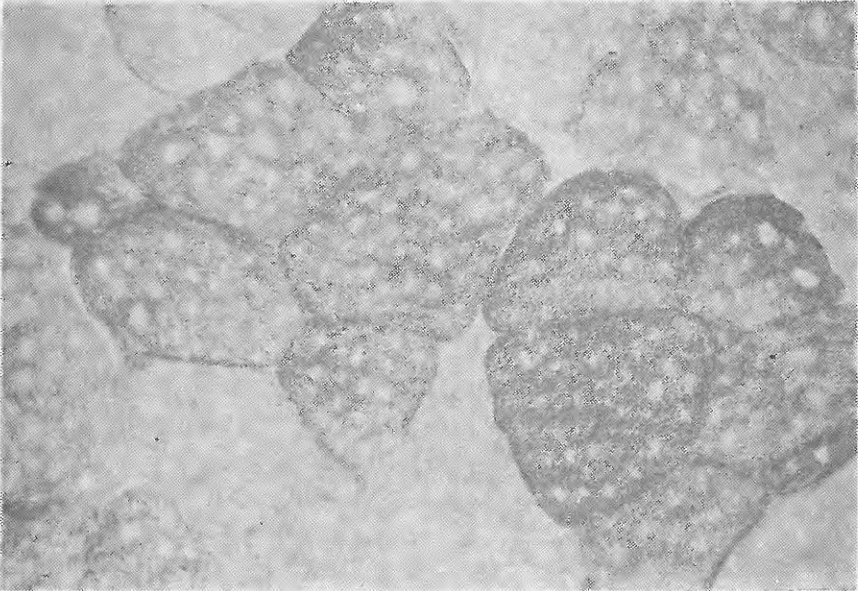
içerisindeki kapiller yapıların adele lifinin içerisine doğru ilerlemesinde dikkatimizi çeken bir bulguydu (Resim 12). Yıkım belirtilerinin şiddeti ile paralel olarak myofibrillerde kaybolma ve çekirdeklerde merkeze doğru yer değiştirme gözlemlendi.

Yapılan PAS boyamalarında, adele liflerinde glikojenin, kontrol ve birinci deney grubuna oranla, azaldığı ancak bu azalmanın her iki tip liftede eşit olması nedeniyle lif ayırımının hala yapılabildiği dikkatimizi çekti (Resim 13).

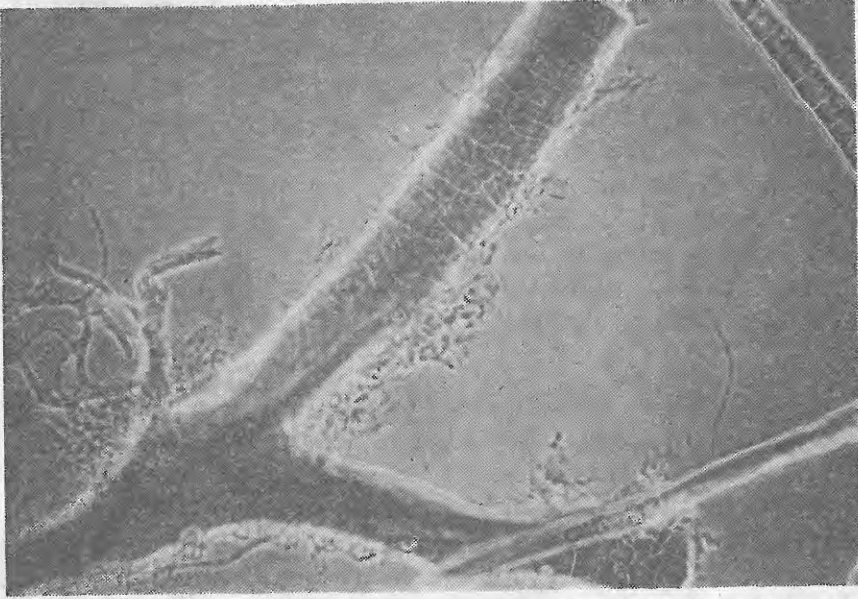
Nitrik asit yöntemi ile elde edilen preparatlarda liflerdeki bölünmelerin gerçek bölünme değil uzunlamasına ayrılmalar olduğu ve bu dejeneratif liflerin yan dallanmalarda gösterdiği izlendi (Resim 14). Yıkım belirtileri gösteren bu lifler permabilite bozulmasına bağlı olarak ortamda şişmişlerdi ve diğer liflerden daha kalın olarak görülüyorlardı. Ayrılma alanının distalinde kalan liflerin çap toplamı ana lif çapından daha büyüktür.



Resim 12 : Resim 11 in büyütülmesi ile elde edilen bu resimde adele lifi içerisine doğru ilerliyen kapiller kesiti görülmektedir (Gomori's trichrome x 950).



Resim 13 : Hipertrofiye uğramış bu adele kesitinde lifler arasındaki büyüklük farkının kaybına karşın glikojen miktarları arasındaki farkın korunduğu ve lif ayırımının yapılabildiği görülmektedir (PAS x 650).



Resim 14 : Ağır egzersiz yapmış bir adeleden hitrik asit disseksiyonu yöntemiyle hazırlanmış bu kesitte yıkıma uğramış bir adelic lifinde uzunlamasına ayrılmalar ve yan dallanmalar görülmektedir. (Phase - contrast x 20).

TARTIŞMA :

Bir araştırmacının çalıştığı konuda başarılı olabilmesi için kullandığı yöntemlerin gayeye uygun ve yeterli olması gerekmektedir. Bunun için biz, adeleyi kendimize konu aldığımız bu çalışmada önce kullanacağımız yöntemlerin yeterliliğini ve ülkemiz şartlarında uygulanabilirliğini araştırdık.

Literatürde yapılan çalışmalarda, adale dokusunda mevcut hastalıkların ortaya çıkarılmasında ve yeni hastalıkların tanımlanmasında klasik yöntemlerin yetersiz olduğu belirtilerek doğru tanıya varabilmek için modern histokimyasal yöntemlerin, özellikle enzimatik reaksiyonların, elektronmikroskopik yöntemlerin ve elektron mikroskobu ile kombine edilmiş histokimyasal reaksiyonların uygulanmasının zorunlu olduğu kaydedilmiştir (5, 12).

Patoloji uygulama alanında histokimyasal reaksiyonlardan başarılı sonuçların alınabilmesi için doku örneklerinin dokuya zarar vermeyecek yöntemlerle hazırlanması gerekmektedir. Bu nedenle biz frozın kesitlerinin esas olduğu bu çalışmamızda önce dondurma yöntemlerinin karşılaştırmasını yaptık ve sonuç olarak karbondioksit karının dokuda yıkıma yol açarak patolojik olayların gözlenmesini zorlaştırdığını buna karşın şok tarzında dondurma imkânı sağlayan sıvı nitrojenin dokunun yapısını tam koruduğunu izledik. Buda bize dondurma işleminde sıvı nitrojenin kullanılmasının zorunlu olduğunu göstermiştir.

Uyguladığımız histokimyasal yöntemlerden, adelenin morfolojik yapısını ortaya çıkarmada, en başarılı sonuç Gomori'nin trikrom boyamasının vermesi ve lif tipi ayırımında istenilen sonuca myosin ATP ase aktivitesini göstermede kullanılan kalsiyum yöntemiyle ulaşılması, bize bu iki yöntemin üstünlüğünü göstermiştir. Buna ilave olarak bu yöntemlerin uygulanmasının kolay olması ve kullanılan reaktiflerin ucuz ve dayanıklı olmasında bir başka tercih sebebi olabilir.

Giriş kısmında da belirttiğimiz gibi normal iskelet adelesinde tip - I, tip - IIA ve tip - IIB olmak üzere iki gurupta üç tip lif bulunduğu gösterilmiştir (5, 7, 9, 10, 12).

Biz bu çalışmamızda kontrol gurubu hayvanlardan aldığımız adele örneklerinin hepsinde, myosin ATP ase reaksiyonlarında, tip - II liflerde olduğu gibi tip - I liflerinde iki ayrı yoğunlukta boyandığını ve bu yoğunluk farkının tip - IIA ve tip - IIB arasındaki kadar olduğunu belirtmiştik. Bu bulgumuz bize tip - I liflerinde tip - IA ve tip - IB olarak ayırmanın daha gerçekçi olacağını düşündürmüştür.

Adelelerin lif kompozisyonlarını ortaya çıkarmak için yapılan çalışmalarda, bütün adelerin her iki tipide içeren karışık bir yapıya sahip olduğu belirtilerek insanda tip - II liflerden en zengin adele olarak M. biceps brachii ve kırmızı liflerin beyaz liflerden daha geniş alan işgal ettiği tek adele olarak M. vastus lateralis gösterilmiştir (7).

Bulgular kısmında belirtildiği gibi incelediğimiz dört adelenin karışık bir yapıya sahip olması ve lif kompozisyonunun adeleden adeleye ve aynı adelede bölgeden bölgeye değişmesi literatüre paralel bulgular olarak ortaya çıkmıştır.

Ağırlığını hareket sistemi üzerinde hissettiren ancak organizmayı bütünüyle ilgilendiren sportif faaliyetlerin, değişik şiddetlerde uygulandığında, adele dokusu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla ile klinik vakalar, gönüllü sporcular ve deneysel hayvan modelleri üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır (1, 3, 4, 6, 8, 11, 13).

İnsan materyeli üzerinde yapılan literatür çalışmalarında, ağır spor yapanlarda, süksinik dehidrogenaz aktivitesinin en yüksek olduğu, ST liflerin hakimiyetinin arttığı, oksidatif enzim aktivitelerinin ve glikojen miktarının kontrollere oranla çok yüksek olduğu ve glikojen miktarının artan işe paralel olarak süratle düştüğü bildirilmiştir (9, 10). Edström'un ağırlık kaldıran sporcularla mukavemet sporcularında yaptığı karşılaştırmalı çalışmada, ağırlık kaldıran atletlerde beyaz liflerin çaplarının diğer atletlerinkine oranla daha büyük olduğu ve mukavemet sporcularındaki yapının kontrollerle aynı olduğu gösterilmiştir (8).

Sporcular üzerinde yapılan diğer çalışmalarda kadın ve erkek atletler arasındaki farkın sadece adele liflerinin tuttukları alan bakımından olduğu, enzim seviyelerinin kontrollere oranla yükseldiği, enzim seviyeleri ile oksijen tutulumu arasında doğru oran bulunduğu (6), izometrik tansiyonların sporcularda daha uzun süreyle daha yüksek seviyelerde korunduğu (4) ve tip - II lifler içerisinde, kontrollerde % 65 olan, tip - IIA oranının sporla % 75 e çıktığı bildirilmiştir (1).

Cerrahi işlemle sinerjistleri çıkarılarak iş yükleri artırılmış adelere sahip hayvan deney modelleri üzerindeki çalışmalarda ağır egzersizlerle adele dokusunda 10 - 20 gün içerisinde yüksek seviyede bir hipertrofinin geliştiği, adele ağırlığının % 151 e kadar varan bir artış gösterdiği, lif çaplarının aşırı büyüdüğü, bazı liflerde muhtemelen yıkıma bağlı olarak uzunlamasına ayrılmaların ve yan dallanmaların geliştiği, çekirdeklerin merkeze doğru yer değiştirdiği, dejenere adele liflerinin çevresinde damarsal yapılar-

dan zengin bağ dokusunun geliştiği ve uzunlamasına ayrılma alanlarından kapillerin liflerin içerisine doğru ilerlediği gösterilmiştir (11,13). Bir başka çalışmada sporun adele lif kompozisyonundaki kırmızı liflerin oranını artırdığı kaydedilmiştir (3).

Bizim yaptığımız bu çalışmada, literatürle uyumlu olarak, fizyolojik şartlarda spor yaptığımız sıçanlarda herhangi bir patolojik değişim meydana gelmedi. Sadece kontrol hayvanlarda gözlediğimiz tip - I ve tip - II liflerin kendi aralarında iki alt gruba ayrılma özelliğinin kaybolduğunu gördük. Myosin ATP ase reaksiyonlarında saptadığımız bu bulgu bize, tip - I ve tip - II liflerdeki enzim seviyelerinin alt sınırlarının değişmez olduğunu ve sporla harcanan enzim miktarlarının bu seviyelerde eşitlenerek tek tip lif görüntüsü verdiğini düşündürmüştür.

Cerrahi işlemle adelerinin iş yüklerini artırarak ağır egzersiz yaptırdığımız ikinci deney gurubundaki sıçanlarda saptadığımız bulgular, özellikle bulgular kısmında belirttiğimiz lif yıkılımını gösteren değişiklikler, liflerdeki uzunlamasına ayrılmalar ve yan dalanmalar, ağır sportif faaliyetlerin adele dokusunda yıkıma neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca sinerjistleri ile birlikte kendi kitlelerinde bir kısmını çıkararak iş yüklerini dahada artırdığımız M. triceps brachii ve M. rectus femoris adelerinde yıkım belirtilerinin daha yaygın bir şekilde ortaya çıkması, artan iş yükü ile yıkım olayı arasında bir paralelliğin bulunduğunu göstermiştir.

Ağır iş yükü altında bırakılmış adele liflerinde izlediğimiz uzunlamasına ayrılmalar ve yan dallanmaların, özellikle dejenerasyon belirtileri gösteren liflerde ortaya çıkması, bize bu bulguların adelede bölünerek çoğalmanın değil yıkıma doğru gidişin bir göstergesi olarak değerlendirmenin daha doğru olacağını düşündürmüştür.

Literatürde verilen bilgiler ve bizim bu araştırmamızda saptadığımız bulgular gözönüne alındığında egzersizlerin etkisinde meydana gelen adele kitlelerindeki ağırlık artışının liflerdeki bölünerek sayıca çoğalmaya değil, aynı sayıdaki liflerin hacimlerindeki artışa bağlı olarak geliştiğini söylemenin daha uygun olacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

- (1) Anderson, P. and Henrikson, J.: Training induced changes in the subgroups of human type - II skeletal muscle fibres. *Acta. Physiol. Scand.* 99 : 123 -125, 1977.
- (2) Bancroft, J.D. and Stevens, A.A.: *Theory and practice of histological techniques.* 1 th Ed. Edinburg, London and New York, Churchill livingstone, 1977. p. 287 -305.
- (3) Bernard, R.J., Edgerton, V.R. and Peter J.B.: Effect of exercise on skeletal muscle. I - Biochemical and histochemical properties. *J. Appl. Physiol.* 28 (6) : 762 -766, 1970.
- (4) Bernard, R.J., Edgerton, V.R. and Peter, J.B.: Effect of exercise on skeletal muscle. II - Contractile properties. *J. Appl. Physiol.* 28 (6) : 267 -270, 1970.
- (5) Climie, A.R.W.: Muscle biopsy : Technic and interpretation. *Am. J. Clin. Pathol.* 60 : 753 -770, 1973.
- (6) Costill, D.L., Evans, J.D.W., Fink, W., Krahenbuhl, G. and Saltin, B.: Skeletal muscle enzymes and fiber composition in male and female track athletes. *J. Appl. Physiol.* 40 (2) : 149 -154, 1976.
- (7) Edström, L. and Nyström, B.: Histochemical types of fibres in normal human muscle. *Acta. Neurol. Scandinav.* 45 : 257 -269, 1969.
- (8) Edström, L. and Ekblom, B: Differences in sizes of red and white muscle fibres in vastus lateralis of musculus quadriceps femoris of normal individuals and athletes. Relation to physical performance. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 30 : 175 -181, 1972.
- (9) Gollnick, P.D., Amstrong, R.B., Saubertiv, C.W., Piehl, K. and Saltin, B.: Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. *J. Appl. Physiol.* 33 (3) : 312 -319, 1972.
- (10) Gollnick, P.D., Piehl, K. and Saltin, B.: Selective glycogen depletion pattern in human muscle fibres after exercise of varying intensity and at varying pedalling rates. *J. Physiol.* 241 : 45 -57, 1974.
- (11) Hall - Craggs, E.C.B.: The longitudinal division of fibres in overloaded rat skeletal muscle. *J. Anat.* 107 (3) : 459 - 470, 1970.
- (12) Pearse, A.G.E., and Johnson, M.: Histochemistry in the study of normal and diseased muscle, with special reference to myopathy with tubular aggregates.
Excerpta medica international congress, series No. 199, Muscle disease, proceedings of an international congress, Milan, May, 1969, p. 25 -32.

- (13) Reitsma, W. : Skeletal muscle hypertrophy after heavy exercise in rats with surgical reduced muscle function. Am. J. Phys. Med. 48 : 237-258, 1969.
- (14) Smith, M.J. : Muscle fiber types : Their relationship to athletic training and rehabilitation.
The orthopaedic clinics of north America : 14 (2) : 403-411, 1989.