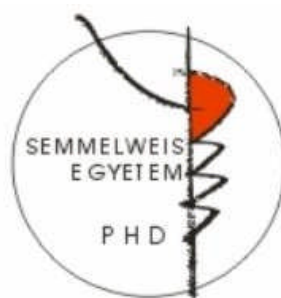


A végtaghosszabbítás hatás az izomszövetre

Doktori tézisek

Dr. Shisha Tamás

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. habil. Szőke György M.Sc. (Oxon), Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Mády Ferenc, Ph.D.

Dr. Viola Sándor, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Vízkelety Tibor, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bender György, egyetemi tanár

Dr. Bucsi László, Ph.D.

Budapest
2008

A végtaghosszabbítás hatás az izomszövetre

Doktori tézisek
Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Dr. Shisha Tamás

Témavezető: Dr. habil. Szőke György, M.Sc.(Oxon), Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Mády Ferenc, Ph.D.

Dr. Viola Sándor, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Vízkelety Tibor, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bender György, egyetemi tanár

Dr. Bucsi László, Ph.D.

Budapest
2008

1. BEVEZETÉS

A végtaghosszabbító eljárások a sebészi technika fejlődésével egyre nagyobb népszerűsége tesznek szert. Alkalmazásukra leggyakrabban akkor kerül sor, ha a két végtag közötti jelentős hosszkülönbség funkcionális zavart okoz. A végtagok hosszkülönbségének hátterében gyakran a még növekedésben lévő csont növekedési porcát érintő kóros behatás, például trauma, tumor, vagy gyulladás áll. Más esetben a végtag fejlődési rendellenesség következtében kialakult rövidegét szükséges korrigálni.

A végtaghosszabbító eljárások során leggyakrabban fellépő súlyos szövődmények az izmok nem megfelelő alkalmazkodásának következményei. Ilyen szövődmény lehet például az érintett izmok kontraktúrája, a subluxáció, a diszlokáció, vagy a mozgástartomány beszűkülése. Ezért a végtaghosszabbítás maximális mértékét *elsősorban* az izomszövet, és nem a csontok tűrőképessége limitálja.

Ennek ismeretében érthető, hogy számos kutatócsoport foglalkozott az elmúlt években a végtaghosszabbítás izomszövetre gyakorolt hatásaival. A folyamatok megértésétől azt várjuk, hogy a klinikai gyakorlatban is alkalmazható olyan tudás birtokába kerülünk, melynek segítségével a súlyos komplikációk gyakorisága és mértéke csökkenthető.

Az izomszövetben a krónikus nyújtás hatására, részben ismert szignáltranszdukciós mechanizmusokon és mediátor molekulák segítségével, részben pedig ismeretlen mechanizmusok által megindul az izomban folyamatosan jelen lévő myogén precursor satellita sejtek mitotikus aktivációja. Ezek a satellita sejtek nélkülözhetetlenek a myofibrillumok genesiséhez, melynek során új sarcomerek képzésével az izomrostok hossza növekedni kezd.

A fenti folyamatok minden izomban „kötelezően” lejátszódnak. Az izom nem megfelelő alkalmazkodása esetén azonban számos további, kóros folyamatot figyelhetünk meg. Ezek közül a leggyakrabban a fibroblastok aktiválódásának köszönhető fibrózist, az izom-ín átmenet közelében intersticiális vérzést, ödémát, az izom részleges, vagy akár teljes ruptúráját figyelhetjük meg. E folyamatok következménye a klinikumban látott szövődmények túlnyomó része.

A korai folyamatok megértése kritikus jelentőségű, mert alkalmas lehet arra, hogy időben, még a klinikailag észlelhető szövődmények megjelenése *előtt* reagáljunk, például a hosszabbítási ráta csökkentésével.

A myogén precursor satellita sejtek mitotikus aktivációjának mérése immunhisztokémiai módszerrel a tudományban ismert módszer. Számos vizsgálat igazolta, hogy a satellita sejtek száma krónikus nyújtás hatására megemelkedik. Nem volt azonban tisztázott, hogy miként alakul a satellita sejtek proliferációja az izomhasban illetve az izom-ín átmenetben, holott ez utóbbi szerepe az új rostok képzésében kiemelkedő. Nem volt ismert továbbá az sem, hogy milyen különbség lehet a fiatal és érett izom viselkedése között. Ez a különbség rávilágíthat arra, hogy miért alkalmazkodik a fiatal izom lényegesen jobban a disztrakcióhoz.

Az izomban nyújtás hatására lejátszódó folyamatok eredményeként hosszú távon az izom-ín komplexek tömegének emelkedését várjuk. A hosszabbítás alatt, illetve közvetlenül utána azonban a tömegcsökkenés sem ritka. Ennek a megfigyelésnek kettős magyarázata van: Az első ok, hogy a hosszabbítással járó műtét és a külső fixátor hatására az érintett végtag mindig relatív immobilizálódik az ellenoldali végtaghoz képest; ez az immobilizáció pedig az izom atrófiájához vezet. A másik ok, hogy a satellita sejtek és az izomrostok képződése időigényes folyamat és ezért a nyújtás során még nem befolyásolja jelentősen az izom tömegét.

Számos folyamat mutathat azonban a tömegnövekedés irányába. Így például több patológiaszöveti reakció, úgy mint az ödéma, fibrózis vagy a vérzés. Ezért az izom tömegének változása fontos mutatója lehet az

izomban lejátszódó kóros folyamatoknak. Mindezek ellenére az irodalomban mindössze néhány eredményt közöltek a hosszabbítás során tapasztalható tömegváltozásról. Ezekben is mindössze egy-egy izom tömegét mérték csak, egy bizonyos hosszabbítási ráta mellett, és az eredmények gyakran egymásnak ellentmondóak voltak. A statisztikailag is értékelhető vizsgálathoz több csoporton, fiatal és felnőtt nyulakon, különböző hosszabbítási ráta mellett kellett megvizsgálni a tömegváltozás irányát és mértékét.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. Az myogén precursor satelita proliferációja

2.1.1 A satelita sejtek számának változása az izom-ín átmenetben

Célunk volt annak kimutatása, hogy miként alakul a satelita sejtek proliferációja az izom-ínátmenetben. Feltételeztük, hogy a korábbi eredményeknek megfelelően, számuk növekedését fogjuk tapasztalni. Célunk volt továbbá a fiatal és felnőtt állatokban tapasztalható aktiváció összehasonlítása.

2.1.2 A satelita sejtek számának változása az izomhasban

Hasonlóan az izom-ín átmenethez, célunk volt az izomhasban is megmérni a satelita sejtek aktivációjának mértékét mind fiatal, mind pedig felnőtt állatokban. Korábbi tanulmányok azt feltételezték, hogy az izomrostok képződése és a satelita sejtek proliferációja kizárólag az izom-ín átmenetben történik, így elképzelhetőnek tartottuk, hogy semmiféle mitotikus aktivitást nem fogunk mérni.

2.1.3 A satelita sejtek eloszlásának változása

Ha az izomhasban, és az izom-ín átmenetben egyaránt növekszik a satelita sejtek száma, akkor érdekes lehet, hogy egyforma mértékű-e a növekedés a két régióban. Ha a nyújtás hatására nem csak a sejtek abszolút száma, de eloszlása is megváltozik, akkor ez érzékeny mutatója lehet a kórossá váló folyamatoknak. Ezért célunk volt annak megállapítása, hogy történik-e a satelita sejtek megoszlásában jelentős változás a hosszabbítás hatására.

2.2 Az izomtömeg változása

2.2.1 Az izomtömeg változása a különböző izom-csoportokban

Feltételeztük, hogy a különböző izomcsoportok különbözőféleképpen reagálhatnak a hosszabbításra. A hosszabb izom-ín komplexek, mivel relatíve kevésbé nyúlnak, jobban tolerálhatják a hosszabbítást. Célunk volt megvizsgálni, hogy a jó és rossz alkalmazkodás milyen irányú és mértékű tömegváltozást eredményez.

2.2.2 Az izomtömeg változása fiatal és felnőtt állatokban

A klinikai tapasztalat és korábbi eredmények alapján feltételeztük, hogy a fiatal nyulak jobban tolerálják a hosszabbítást, mint a felnőttek. Célunk volt annak megvizsgálása, hogy ez a körülmény befolyásolja-e a tömegváltozás irányát vagy mértékét.

2.2.3 Az izomtömeg változásának okai

Célunk volt nem csak a tömegváltozás adatok regisztrálása, de a szövettani eredményekkel való közös értékelés után a tömegváltozás okainak pontos tisztázása is.

2.2.4 Az izomtömeg változása, mint predikciós faktor

A fenti vizsgálatok összegzéseként azt szeretnénk volna megállapítani, hogy a tömegváltozás, vagy egy azzal szorosan korreláló paraméter, például a végtag körfogata, a végtag vagy az egyes izmok térfogata, használható lenne-e, mint a hosszabbítás során fellépő szövődmények korai indikátora.

2.3. Hisztopathológia

A különböző ráta mellett hosszabbított fiatal és felnőtt nyulak izmainak szövettani elemzését azért végeztük el, hogy árnyalt képet kapjunk az izom különböző régióiban, így az izom-ín átmenetben, az izomhas proximális és disztális harmadában lejátszódó folyamatokról.

Ezeket az eredményeket önmagukban is szeretnénk volna értékelni az izomban lejátszódó kóros hisztológiai folyamatok megértése és az izom különböző régiói közötti különbségek feltárása érdekében.

Másfelől, fontos volt számunkra a hisztológiai háttér pontos ismerete a sejtproliferáció és tömegváltozás eredményeinek értelmezése és interpretálása során is.

3. MÓDSZEREK

A fiatal (9-11 hetes) és felnőtt (27-29 hetes) nyulakat több csoportba osztottuk. A külső fixatőr beszerelése után a tibia diaphysisének középső részén végeztük a callus disztrakcióját. A csontvégeket korábban alkalmazott protokollnak megfelelően 0.8 mm/nap, 1.6 mm/nap, illetve 3.2 mm/nap rátával távolítottuk, a tibia teljes hosszának 20 illetve 30 százalékos növeléséig. A kívánt hosszabbítás elérése után az állat leölését követően kipreparáltuk a hosszabbított és a kontroll oldali izom-ín komplexeket és azonnal elvégeztük azok hossz- és tömegmérést, illetve megkezdtük a szövettani metszetek készítését.

Indirekt immunhisztokémia: A mitotikusan aktív sejtek jelölésére egy timidin analógot használtunk, melyet egy órával az állat leölése előtt adtunk be intravénásan. A bromodeoxiuridin (BrdU) a beadást követően stabilan beépül az osztódó sejtek DNS-ébe. Később a stabilan beépült molekula jelölt antitesttel (Bu20a) láthatóvá tehető a szövettani metszeteken, ahol a mitotikusan aktív magok barnásan festődnek.

Megszámoltuk, hogy a mikroszkóp látóterében látható izomsejteknek hány százaléka jelölt. Ezt az értéket neveztük el *pozitív festődési aránynak*, vagy az irodalomban használt nevén *positive staining indexnek* (PSI). A PSI tehát megmutatja, hogy az adott régióban 100 izomsejtből átlagosan hány darab mitotikusan aktív. A PSI így az izomsejtek proliferatív aktivitásának jó mérőszáma.

A hisztopatológiai változásokat szemikvantitatív módszerrel, Lee pontozási rendszere alapján mértük. Ennek értelmében egy 0-tól 3-ig terjedő skálán értékeltük a metszeteket, ahol a 0 mindig a normális szöveti képnek felelt meg. Kilenc paraméter vizsgálatát végeztük el, a Lee által javasolt öt paramétert további négygel bővítve. Ezek tételesen: 1. izomrost vastagság, 2. izomsejtek internalizációja, 3. izomrost degeneráció, 4. izomrost regeneráció, 5. endomyseális és perimiseális fibrózis, 6. izomsejt

internalizáció az izom-ín átmenetben, 7. sejtszám az izom-ín átmenetben, 8. véredények száma az izom-ín átmenetben és 9. heamatómák az izom-ín átmenetben. Minden metszeten legalább 20 látóteret vizsgálatunk a változás átlagos mértékének megítélése érdekében.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A myogén precursor satellita sejtek proliferációja

- A satellita sejtek mitotikus aktivitása fokozott a hosszabbított izomban a kontroll oldalhoz képest. A hosszabbítás során a pozitív festődési arány (PSI) az izom-ín átmenetben és az izomhasban egyaránt fokozódik.
- A satellita sejtek mitotikus aktivitása fokozott a fiatal izomban a felnőtt izomhoz képest.
- A satellita sejtek mitotikus aktivitása fokozott az izom-ín átmenetben az izomhashoz képest.
- Jelentős hosszabbítás esetén az izomhasban nagyobb mértékű a PSI emelkedése, mint az izom-ín átmenetben. Ez a satellita sejtek eloszlásának izomhas felé való eltolódását mutatja.

4.2. Az izomtömeg változása

- Az operált, de nem hosszabbított („sham”) végtag izmaiban jelentős tömegcsökkenést mértünk.
- A hosszabbított végtag elülső kompartmentjének rövid izmaiban (m. peroneus quartus; m. tibialis anterior) jelentős tömegnövekedést, vagy az izmok részleges illetve teljes ruptúráját tapasztaltuk.

- A hosszabbított végtag hátsó kompartmentjének hosszú izmaiban (m. flexor digitorum longus; m. peroneus longus) az izomtömeg csökkenését tapasztaltuk.

4.3. Hisztopatológiai vizsgálat eredményinek összegzése:

- A fiatal izomban, alacsonyabb rátájú hosszabbítás mellett kevesebb kóros elváltozást mértünk, mint a nagyobb rátájú hosszabbítás esetén felnőtt állatok izmaiban.
- Az elülső kompartment rövid izmaiban (m. peroneus quartus) szignifikánsan több kóros szöveti reakciót találtunk, mint a hátsó kompartmentjének hosszú izmaiban (m. flexor digitorum longus).
- Az izomhas proximális és distális harmada között bár megfigyeltünk különbségeket, de ezek a különbségek többnyire nem érték el a statisztikai szignifikanciát.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A myogén precursor satellita sejtek proliferatív aktivitásuk növelésével reagálnak a hosszabbításra. A természetes növekedés, vagy jól tolerálható nyújtás során ilyen aktivitást szinte kizárólag az izom-ín átmenetben figyeltünk meg. Jelentős mértékű nyújtás során azonban az izomhasban is megindul a satellita sejtek proliferációja. Az izmot károsító mértékű nyújtás során pedig, mellyel az izom-ín átmenetben történő sejtaktiváció nem tud lépést tartani, az izomhasban nagyobb arányú sejtaktiváció figyelhető meg, mint az izom-ín átmenetben. A satellita sejtek eloszlásának ilyen változása mindenképpen kedvezőtlen, hisz a rostképződés fiziológiásan az izom-ín átmenetben történik. Az izomhasban történő aktiváció során, feltehetően az itt felszabaduló lokális mediátorok hatására, megindul egyéb sejtvonalak, például a fibroblastok aktivációja is, mely peri- és endomyseális fibrózishoz vezet.

A fiatal állatok jobb alkalmazkodásának kulcsa éppen abban állhat, hogy a nyújtás során az izomhas és az izom-ín átmenet közötti fiziológiás egyensúly nem bomlik fel. Bár mindkét régióban szignifikánsan emelkedik az osztódó satellita sejtek abszolút száma, ezek aránya azonban nem változik jelentősen.

Az eredmények alátámasztják, hogy az autológ, *izom irányba elkötelezett* őssejtek transzplantációjának a jövőben komoly szerepe lehet a jelentős mértékű végtaghosszabbítás során várható szövődmények gyakoriságának csökkentésében. A satellita sejt állomány mesterséges bővítése hozzájárulhat az egészséges myofibrillumok képződéséhez, anélkül, hogy a fibroblastok számát vagy aktivitását befolyásolná. Az autológ őssejt transzplantáció ilyen irányú felhasználása állatkísérletekben korai, de ígéretes, eredményekkel kecsegtet.

A hosszabbításhoz *jól alkalmazkodó* izmok *tömegcsökkenéssel* reagáltak a hosszabbításra. Ezen tömegcsökkenés oka a relatív immobilizációból adódó izomatrófia. Ez a tény önmagában is felhívja a figyelmet a korai aktív fizioterápia kiemelkedő szerepére. A *rosszul alkalmazkodó* izmok *tömegnövekedéssel* reagálnak. Ennek oka olyan kóros folyamatok eredménye, mint például a fibrózis, ödéma vagy az intersticiális vérzés. A tömegbefolyásoló tényezők közül az izomsejtek proliferációja és izomfehérjék képződése a hosszabbítás alatt és közvetlenül utána még nem hatnak jelentősen az izomtömegre. A fentiek értelmében a tömegváltozás mérése alapján időben, még a klinikai tünetek megjelenése előtt észlelhetjük az izmok nem megfelelő alkalmazkodását. A klinikai gyakorlatban a tömeggel jól korreláló más paraméter nyomon követésével reményünk van arra, hogy időben, még a klinikai tünetek megjelenése előtt avatkozzunk be. A hosszabbítási ráta azonnali csökkentésével a súlyos szövődmények egy része elkerülhető lenne. További vizsgálatok szükségesek annak felderítésére, hogy a számos elképzelhető paraméter közül (pl. végtag térfogata, egyes izmok térfogata, végtag körfogata, stb.) melyek követése lehet alkalmas és hatékony módszer a klinikai gyakorlat számára.

A tézis témájában megjelent közlemények:

1. **Shisha T**, Kiss S, Pap K, Simpson H, Szőke G. Relative ability of young and mature muscles to respond to limb lengthening. *J bone Joint Surg [Br]* 2006; 88-B:1666-9. **IF: 1.790**
2. **Shisha Tamás**, Pap Károly, Kiss Sándor, Szőke György. Izomsejt proliferáció az izom-ín átmenetben végtaghosszabbítás során. *Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet* (in press)
3. **Shisha Tamás**, Kiss Sándor, Pap Károly, Berki Sándor, Antal Imre, Szőke György. Az izom-ín komplexek tömegének változása tibia elongációjára során: a végtaghosszabbítás alatt kialakuló komplikáció korai indikátora. *Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet* (in press)
4. Károly Pap, Sándor Berki, Sándor Kiss, **Tamás Shisha**, Krisztián Szalay, György Szőke. Structural changes in the lengthened rabbit muscle. *International Orthopaedics*. Published online on 08 Feb 2008. DOI: 10.1007/s00264-008-0514-2. ISSN: 0341-2695 (Print) 1432-5195 (Online) **IF: 0.977**
5. Pap Károly, Kiss Sándor, **Shisha Tamás**, Domos Gyula, Holnapp Gergely, Szőke György. Hisztopatológiai elváltozások a harántcsíktal izomban végtaghosszabbítást követően. *Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet* (in press)
6. **Shisha T**, Kiss S, Pap K, G. Simpson H, G. Domos, Szőke G. Mass change in muscles of the elongated limb: an early indicator of complications. *J. Ped Orthop* (in press)
7. Szőke György, **Shisha Tamás**, Kiss Sándor, Pap Károly, Richard Bowen. A végleges végtaghossz predikciójának lehetséges hibái fibula hemiméhiában a Moseley táblázat használata esetén. *Magyar traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet* (in press).

További közlemények:

1. **T. Shisha**, S. Kiss, PP. Varga, K. Pap, G. Szoke. Osteochondritis (Calvé's disease) of a vertebral body – a rare form of vertebra plana. *European Spine Journal* 15: 377-383, 2006. **IF: 1.824**
2. **T. Shisha**, G. Marton-Szucs, M. Dunay, S. Kiss, T. Nemeth, M. Szendroi, G. Szoke. The dangers of intraosseal fibrosing agent injection in the treatment of bone cysts. The origin of major complications shown in a rabbit model. *International Orthopaedics*. 31(3): 359-362, Jul 2006. **IF: 0.977**
3. **Shisha T**, Kiss S., Pap K., Vízkelety T., Szőke Gy. A nyílt repozíció és rövidítéses varizáló derotációs femur osteotomia hosszú távú eredménye a spasztikus betegek csípőluxatiójának kezelésében. *Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet* 50(1): 24-30, 2007.
4. **Shisha Tamás**, Kiss Sándor., Varga Péter Pál., Bucsi László, Szőke György. Járásképtelenséget okozó csigolya osteonecrosis (vertebra plana): esetismertetés. *Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet* 49(4): 382-388, 2006.
5. **Shisha Tamás**, Köllő Katalin, Kiss Sándor, Szőke György. Bacillus Camette-Guerin osteomyelitis, a BCG oltás ritka szövődménye. *Osteológiai közlemények* 4: 203-206, 2005.

6. **Shisha Tamás**, Marton-Szűcs Gábor, Dunai Miklós, Kiss Sándor, Németh Tibor, Szőke György. Fatális komplikációk intraosseális Ethybloc beadását követően, nyulakon. Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet (in press)
7. Domos Gyula, Rosero V. Maja, **Shisha Tamás**, Terebessy Tamás, Kiss Sándor, Szőke György. Tarsalis coalitiora jellemző lábdeformitást okozó juxtaarticularis calcaneus osteoid osteoma. Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet (in press)
8. Károly Pap, Sándor Kiss, **Tamás Shisha**, Gábor Marton-Szűcs, and György Szőke. The incidence of avascular necrosis of the healthy, contralateral femoral head at the end of the use of Pavlik harness in unilateral hip dysplasia. International Orthopaedics. Published online on 26 April 2006. DOI: 10.1007/s00264-006-0113-z. ISSN: 0341-2695 (Print) 1432-5195 (Online) **IF: 0.977**

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

A jelen tézis megírása és a négyévnyi kutatómunka során mindvégig emberek sokaságának segítségére támaszkodhattam. Munkájuk olyan jelentős mértékben járult hozzá az itt bemutatott eredményekhez, hogy megköszönni pár sorban nem is lehet. Munkájukért és barátságukért tisztelettel kell köszönetet mondanom a következőknek:

Dr. Szőke Györgynek, tanáromnak és mentoromnak, akitől az elmúlt hét év során nemcsak tudományos útmutatást kaptam, de akitől tudomány iránti odaadást, szerénységet és emberséget is tanulhattam. Támogatása teljes tudományos munkásságomat végigkísérte, az út kijelölésétől a jelen tézis megalkotásáig. Az évek során egyszerre volt tanárom, kollegám és barátom, mindig éppen az, amelyikre a legnagyobb szükségem volt.

Hamish Simpsonnak, az Edinburgh-i Egyetem Professzorának, akivel az utóbbi három évben igen szoros együttműködés alakult ki, és akinek szakértelme a végtaghosszabbítás területén világviszonylatban is kiemelkedő. Munkája és segítése felbecsülhetetlen értékű volt a metodika kidolgozásában, a szövettani metszetek értékelésében, az immunhisztokémiai eljárás kidolgozásában és gyakorlati alkalmazásában, illetve a tudományos cikkek megírásában.

A Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáján több embernek tartozom hálás köszönettel, Vízkelety Professor Úrnak, Dr. Kiss Sándornak, Dr. Pap Károlynak, a szövettani labor munkatársainak kitartó, áldozatos munkájukért.

A Szent István Állatorvostudományi Egyetem Sebészet Osztály tanszékvezetőjének, Dr. Németh Miklósnak és kollegájának Dr. Dunay Miklósnak, akik az állatokon végzett beavatkozások előkészítése és lebonyolítása során mindig rendelkezésünkre álltak.