

بررسی تاثیر تزریق اسید هیالورونیک در مفصل هیپ در پیشگیری از عارضه استئوکندرونگروز در سگ

دکتر علی اکبر اسماعیلی جاه (M.D.)^۱ - دکتر مهدی دهقان (Ph.D.)^۲ * دکتر محمدعلی اخوت پور (M.D.)^۱ - دکتر افشین زاهدی (Ph.D.)^۳ -
مهندس فرشاد صفدری (M.Sc.)^۴

*نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

پست الکترونیک: okhovatpour@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله ۸۹/۶/۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۱۱

چکیده

مقدمه: شکستگی گردن فمور شایع است و در بسیاری از موارد پس از آن استئونگروز بروز می کند. اخیراً گزارش‌هایی از بکارگیری موفقیت آمیز اسید هیالورونیک بر پیشگیری از تخریب غضروف و احتمال تاثیر آن بر پیشگیری از استئوکندرونگروز ارائه شده است.

هدف: تعیین تاثیر تزریق داخل مفصلی اسید هیالورونیک بر پیشگیری از استئوکندرونگروز به دنبال استئوتومی گردن فمور.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی ۲۰ قلابه سگ پس از استئوتومی گردن فمور و فیکسایون با پین بررسی شدند. سگ‌ها به‌طور تصادفی به دو گروه مورد (اسید هیالورونیک) و شاهد (نرمال سالین) تقسیم شدند. ۱۰ سی سی ماده مورد نظر در دو دوز با فاصله یک هفته به داخل مفصل هیپ تزریق شد. پس از ۸ هفته سگ‌ها کشته شده و بروز استئوکندرونگروز ابتدا با MRI و سپس از نظر آسیب‌شناسی بررسی شد. در نهایت داده‌ها با آزمون دقیق فیشر و t مورد قضاوت آماری قرار گرفتند. در این مطالعه $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

نتایج: در هر گروه یک مورد پیش از پایان مراحل تحقیق تلف شدند. بروز استئوکندرونگروز در گروه شاهد ۵ نمونه و در گروه مورد ۲ نمونه بود ($p < 0.05$) که گرچه تفاوت معنی دار نبود اما شانس استئوکندرونگروز با تزریق اسید هیالورونیک ۲/۲ برابر کاهش داشت. میزان ارزش اخباری مثبت MRI ۳۳/۳ درصد و ارزش اخباری منفی MRI در تشخیص استئوکندرونگروز ۵۸/۳ درصد بود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تزریق اسید هیالورونیک در پیشگیری از استئوکندرونگروز بعد از استئوتومی گردن فمور موثر باشد.

کلید واژه‌ها: بافت مردگی استخوان / برش استخوان / تزریق / سگ‌ها / شکستگی گردن استخوان ران / هیالورونیک اسید

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیستم شماره ۷۸، صفحات: ۱۶-۲۰

مقدمه

سلولی با مهار واسطه‌های بیوشیمیایی تخریب مانند اکسید نیتریک باشد. حال پرسش اینست که آیا تزریق این ماده می‌تواند در پیشگیری از استئوکندرونگروز بدنال شکستگی گردن فمور نیز موثر باشد؟ چون این مورد تاکنون بررسی نشده این تحقیق روی سگ‌ها در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی با استفاده از سگ که نزدیک‌ترین الگوی Avascular Necrosis (AVN) به انسان است (۱۷) در دو گروه مورد و شاهد ۱۰ تایی، تاثیر تزریق هیالورونیک اسید در جلوگیری از پیشرفت استئوکندرونگروز بررسی شد. پس از

یکی از نگرانی‌ها بدنال شکستگی گردن فمور، بروز استئوکندرونگروز است (۱) که بروز آن ۱۱ تا ۸۴ درصد گزارش می‌شود (۵-۲). در حال حاضر برای پیشگیری از این عارضه تلاش می‌کنند در کمترین زمان ممکن شکستگی جاناندازی و ثابت شود (۹-۶). گاهی روش‌هایی چون کپسولوتومی برای کاهش فشار داخل مفصل هیپ و کاهش این عارضه بکار می‌رود (۱۳-۱۰). اما در صورت بروز استئوکندرونگروز، تخریب مفصل و ایجاد استئوآرتریت آتی بسیار محتمل خواهد بود (۱۴).

نقش اسید هیالورونیک را در کند کردن سیر تخریب غضروف نشان داده‌اند (۱۵ و ۱۶). تصور می‌کنند مکانیسم اصلی اثر اسید هیالورونیک در جلوگیری از تخریب ماتریکس بین

مفصلی آنها نداشت. تمام سگ‌ها نر بودند و سن همگی بین یک تا دو ساله برآورد شد. وزن سگ‌های گروه شاهد 35 ± 7 و گروه تجربی 34 ± 6 کیلوگرم بود که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P < 0.8$).

توزیع بروز استئوکندرونکروز و تفکیک تشخیص بر اساس آسیب‌شناسی و MRI در سر فمور سگ‌ها جدول ۱ ارائه شده است و نشان می‌دهد که بروز آسیب در گروه شاهد در ۵ سگ ($55/6$ درصد) و در گروه مورد در ۲ سگ ($22/2$ درصد) رخ داده است. در گروه شاهد در ۳ سگ در بررسی MRI و در گروه مورد نیز در ۳ سگ عارضه گزارش شد. ولی با تزریق، شانس بروز AVN $2/2$ برابر کاهش یافت ($RR=2/2$). آزمون دقیق فیشر نشان داد که بروز استئوکندرونکروز بدنبال تزریق اسید هیالورونیک در دو گروه به لحاظ آماری معنی‌دار نیست ($p < 0/15$).

مقایسه ۱۸ مورد گزارش MRI با گزارش پاتولوژی به عنوان استاندارد تشخیص در جدول ۲ ارائه شده و نشان می‌دهد که از ۷ نمونه‌ای که عارضه استئوکندرونکروز در پاتولوژی تشخیص داده شده بود ۵ مورد در گزارش MRI بدون این عارضه بوده‌اند و از ۱۱ نمونه‌ای که در پاتولوژی دچار این عارضه نبودند، ۴ مورد در بررسی MRI استئوکندرونکروز داشتند. یعنی در MRI، ۵ مورد پیش‌بینی منفی کاذب و ۴ مورد مثبت کاذب وجود داشت به عبارت دیگر در مجموع ۹ مورد (50 درصد) تشخیص‌ها، کاذب (FP: false positive; FN: false negative) بود که این اختلاف از لحاظ آماری آزمون دقیق فیشر معنی‌دار بود ($P < 0.004$).

جدول ۱: مقایسه تشخیص استئوکندرونکروز با روش پاتولوژی و

MRI در دو گروه شاهد (سالمین) و مورد (اسید هیالورونیک)

MRI		پاتولوژی		تعداد	وجود استئوکندرونکروز گروه مورد بررسی
داشته +	نداشته -	داشته +	نداشته -		
۳	۶	۵	۴	۹	نرمال سالمین (شاهد)
۳	۶	۲	۷	۹	اسید هیالورونیک (تجربی)
$P < 0.9$		$P < 0.9$			نتیجه آزمون

از جنبه دیگر اگر MRI وجود ضایعه را تایید نکند، به احتمال

آماده‌سازی نمونه‌ها (واکسیناسیون، انگل‌زدائی و بررسی رادیوگرافی اولیه جهت اطمینان از سلامت هیپ مورد نظر) جهت رعایت مسایل اخلاقی در کار تحقیقاتی انجام شده، سگ‌ها قبل از جراحی با تزریق دیازپام + کتامین به صورت داخل عضلانی بیهوش (Diazepam: 0.32mg/kg Ketamin: 5.2mg/kg) سپس با استئوتومی گردن ران و ثابت کردن محل شکستگی با ۳ پین و قطع لیگامنتوم ترس، استئونکروز بوجود آورده شد. روش جراحی در تمام موارد یکسان بود و در خاتمه عمل و پس از دوختن کپسول مفصلی در گروه مورد، ۵ سی‌سی اسید هیالورونیک و در گروه شاهد ۵ سی‌سی نرمال سالین داخل مفصل هیپ تزریق شد. جهت هم زمان کردن بررسی دو گروه و نداشتن فضا و امکانات لازم، این بررسی طی دو فاز و در هر فاز بر ۵ قلاده سگ مورد و ۵ قلاده سگ شاهد انجام شد. سپس، در گروه مورد به تواتر ۲ نوبت و فاصله یک هفته در میان اسید هیالورونیک و در گروه شاهد به همین روش آب مقطر به داخل مفصل هیپ تزریق شد (زیر guide سونوگرافی) سر فمور هر دو هفته یک بار با انجام رادیولوژی ساده از نظر بروز تغییر پیگیری شد. پس از ۸ هفته که زمان مورد انتظار برای ایجاد AVN است، حیوانات مجدداً به اطاق عمل برده شدند و پس از Vital perfusion (جهت جلوگیری از تخریب غضروف پس از مرگ حیوان) و کشتن حیوانات، نمونه سر فمور دو طرف آماده و برای بررسی رادیولوژی، MRI و آسیب‌شناسی ارسال شد. نواحی سطحی استخوان سر فمور و غضروف مفصلی با MRI از نظر تغییر سیگنال و علائم نکروز توسط دو متخصص رادیولوژی و یک متخصص ارتوپدی بررسی شد و شواهد پاتولوژی استئوکندرونکروز نیز در لام‌های تهیه شده توسط دو متخصص پاتولوژی در هر دو سمت بررسی شد.

پس از جمع‌آوری، داده‌ها با استفاده از آزمون دقیق فیشر مورد قضاوت آماری قرار گرفتند.

نتایج

از ۲۰ قلاده سگ در دو گروه مساوی ۱۰ تایی، در هر گروه یک مورد قبل از نمونه‌برداری نهایی مردند و علت مرگ در آنها عفونت تنفسی گزارش شد که ارتباطی به تزریق داخل

اسید هیالورونیک احتمالاً تزریق آن در مواردی که حیات سلول‌های استخوانی و غضروفی به مخاطره می‌افتد از جمله دررفتگی و شکستگی‌های با احتمال آسیب خون‌رسانی همانند گردن فمور می‌تواند سودمند باشد و تا حدودی از میزان بروز چنین مشکلاتی بکاهد.

در مطالعات قبلی عمدتاً تاثیر تزریق اسید هیالورونیک در حفظ ماتریکس بافت غضروف و کاهش مدیاتورهای مخرب آن اثبات شده بود. مثلاً در مطالعه Kubayashi اثر تزریق اسید هیالورونیک در کاهش NO مایع مفصلی که از عوامل تخریب غضروف مفصلی محسوب می‌شود و کاهش تخریب پروتئوگلیکان‌های ماتریکس بین سلولی بافت غضروف گزارش شده است (۱۸). پیش از این نیز Takahashi (۱۹) تاثیر تزریق HA را بر کاهش MMP3 و IL-1 مایع مفصلی در مدل حیوانی (خرگوش) نشان داده‌بود. ما در این مطالعه با توجه به نبود امکانات بررسی آزمایشگاهی سطح MMP3 و NO و مهار کننده متالوپروتئیناز I در کشور، این بررسی را انجام ندادیم اما شاید اندازه‌گیری آنها در مایع مفصلی نقش تزریق اسید هیالورونیک را در لایه‌های سطحی تر غضروف مفصلی که بوسیله MRI و سایر روش‌های تشخیص خوبی قابل ارزیابی نیست، بهتر نشان دهد و ضمناً بتوان اثر سیتوتوکسیسیته این مدیاتورها را نیز به‌طور مجزا بررسی کرد. آنچه این مطالعه را از سایر تحقیقات در این زمینه متمایز می‌سازد بررسی اثر اسید هیالورونیک در سطح سلولی (و نه بیوشیمیایی) است که در واقع اساس پیش‌بینی تخریب یا عدم تخریب آتی بافت است.

یکی از یافته‌های مهم و با ارزش این تحقیق این بود که MRI در تشخیص قطعی عارضه استئوکندرونکروز مفید نیست. البته ما در این قسمت با محدودیت‌های جدی از قبیل تعداد کم نمونه‌ها روبرو بودیم زیرا توصیه شده‌است که باید حداقل ۴۰ نمونه با ضایعه و ۴۰ نمونه بدون ضایعه وجود داشته‌باشد (۲۰). طبعاً تعداد ۱۸ نمونه نمی‌تواند برای این نتیجه‌گیری کافی باشد.

محدودیت‌های این تحقیق شامل مطالعه بر الگوی حیوانی، تکنیک دشوار استئوتومی، تعداد کم نمونه‌ها، مشکل ترمیم کامل کپسول مفصلی پس از استئوتومی، ثابت کردن و چسبندگی

۵۸/۳٪ آن ضایعه وجود ندارد (NPV=58.3%) و اگر MRI وجود ضایعه را نشان دهد به احتمال ۳۳/۳٪ ضایعه پاتولوژی نیز وجود دارد (PPV=۳۳/۳٪).

جدول ۲: توزیع سر فمور سگ‌های مورد بررسی از لحاظ

استئوکندرونکروز به تفکیک روش‌های تشخیصی

تجزیه و تحلیل	تشخیص پاتولوژی		جمع
	نداشته	داشته	
نداشته	۷	۵ (FN)	۱۲
داشته	۴ (FP)	۲	۶
جمع	۱۱	۷	۱۸

FN= False Negative FP= False Positive

بحث و نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان داد که تزریق اسید هیالورونیک به داخل مفصل هیپ از نظر آماری تاثیر معنی‌دار بر پیشگیری از استئوکندرونکروز نواحی سطحی سر فمور و غضروف مفصلی ندارد اگرچه می‌تواند میزان بروز آن را ۲/۲ برابر کاهش دهد. شاید یکی از دلایل نبود تفاوت آماری معنی‌دار، حجم کوچک نمونه باشد. در این مطالعه پس از تزریق اسید هیالورونیک (HA) میزان بروز تغییر پاتولوژی و MRI در لایه‌های سطحی استخوان سر فمور و غضروف مفصلی پس از القای نکروز آواسکولار بررسی شده‌است. همان‌طوری که در مقدمه مقاله آمده تا به حال تحقیقی در مورد تاثیر این اسید در پیشگیری از عارضه استئوکندرونکروز انجام نشده یا در دسترس نویسندگان نبوده است. به‌عنوان یک فرضیه علت تاثیر HA در سیر مرگ سلولی غضروف و استخوان (کندروسیت، استئوبلاست و استئوسیت) می‌تواند به دلیل مهار تخریب ماتریکس بین سلولی غضروف و پایدار نگهداشتن شرایط محیطی و مکانیکی بافت برای ادامه حیات سلولی تا برقراری مجدد احتمالی جریان خون بدنبال عروق‌گیری مجدد (revascularization) باشد. ضمناً مدیاتورهای آزاد شده در سیر نکروز آواسکولار از جمله NO (Nitric Oxide) مکانیسم نسبتاً ناشناخته‌ای در تخریب غضروف دارند ولی می‌توان برای آنها اثر سیتوتوکسیسیته هم متصور شد.

به هر حال گرچه با توجه به محدود بودن امکان افزایش حجم نمونه بهتر است نتایج بدست آمده با احتیاط تفسیر شوند ولی با کاهش ۲/۲ برابری شانس بروز استئوکندرونکروز با تزریق

مطالعه دوسوکور بوده و تقریباً به صورت *In vitro* انجام شد تا اعتبار داخلی آن بالا رود. ضمناً آزمون‌های آماری مناسبی لحاظ شده‌است. در این مطالعه از یک استاندارد طلائی یعنی *In Vivo* پاتولوژی استفاده کرده‌ایم که این بررسی در مطالعه *In Vivo* تقریباً محال است. به‌رحال چون بررسی پاتولوژی برای تشخیص استئوکندرونکروز به‌طور معمول میسر نیست پیشنهاد می‌شود که روش‌های دیگر تشخیصی نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

کپسول در حین تزریق‌های بعدی بود.

اما از طرف دیگر انتخاب مدل حیوانی به دلیل اخلاقی بوده‌است زیرا بررسی اولیه در انسان قابل قبول نیست. برای تامین اعتبار داخلی (*internal validity*) مجبور به یکسان‌سازی روش شکستگی گردن فمور به کمک استئوتومی شدیم. اما از طرف دیگر این تحقیق جنبه‌های مهمی از نظر متدولوژی داشت: تشخیص بروز عارضه با روش پاتولوژی و MRI و

منابع

- Catto M. A Histological Study Of Avascular Necrosis Of The Femoral Head After Transcervical Fracture. *J Bone Joint Surg Br* 1965;47:749-776.
- Garden RS. Malreduction And Avascular Necrosis In Subcapital Fractures Of The Femur. *J Bone Joint Surg Br* 1971;53:183-196.
- Barnes B, Dunovan K. Functional Outcomes After Hip Fracture *Phys Ther* 1987;67:1675-1679.
- Catto M. The Histological Appearances Of Late Segmental Collapse Of The Femoral Head After Transcervical Fracture. *J Bone Joint Surg Br* 1965;47:777-791.
- Sevitt S, Thompson RG. The Distribution And Anastomoses Of Arteries Supplying The Head And Neck Of The Femur. *J Bone Joint Surg Br* 1965;47:560-573.
- Moore AT. Hip Joint Fracture (A Mechanical Problem). *Instr Course Lect* 1953;10:35-49.
- Garden RS. The Significance Of Good Reduction In Medial Fractures Of The Femoral Neck. *Proc R Soc Med* 1970;63: 1122.
- Garden RS. Reduction And Fixation Of Subcapital Fractures Of The Femur. *Orthop Clin North Am* 1974;5:683-712.
- Garden RS. Stability And Union In Subcapital Fractures Of The Femur. *J Bone Joint Surg Br* 1964;46:630-647.
- Strömqvist B, Brismar J, Hansson LI, Et Al. Technetium-99m-Methylendiphosphonate Scintigraphy After Femoral Neck Fracture: A Three-Year Follow-Up Study. *Clin Orthop* 1984; 182: 177-189.
- Strömqvist B. Hip Fracture In Rheumatoid Arthritis. *Acta Orthop Scand* 1984; 55: 624-628.
- Crawford HB. Experience With The Non-Operative Treatment Of Impacted Fractures Of The Neck Of The Femur. *J Bone Joint Surg Am* 1965;47: 830-831.
- Phemister DB. Repair Of Bone In The Presence Of Aseptic Necrosis Resulting From Fractures, *Transplantations, And Vascular Obstruction. J Bone Joint Surg* 1930; 12:769-787.
- Esmaili Jah AA, Jazayeri SM, Farahmandi MV, Kalhor Moghaddam A. Total Hip Arthroplasty In 40 Years Old Patients Or Younger In Comparison With Old Ones. *Medical Journal Of Iranian Red Crescent*. 2005; 8(2): 69-76.
- Takahashi K, Goomer R.S., Harwood F., Kubo T., Hirasawa Y., Amiel D. The Effects Of Hyaluronan On Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3), Interleukin-1 α (IL-1 α), And Tissue Inhibitor Of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) Gene Expression During The Development Of Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 1999; 7: 182- 190.
- Kobayashi K, Matsuzaka S, Yoshida Y, Miyachi S, Wada Y, Moriya H. The Effects Of Intraarticularly Injected Sodium Hyaluronate On Levels Of Intact Aggrecan And Nitric Oxide In The Joint Fluid Of Patients With Knee Osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12(7):536-42.
- Boss JH, Misselevich I. Osteonecrosis Of The Femoral Head Of Laboratory Animals: The Lessons Learned From A Comparative Study Of Osteonecrosis In Man And Experimental Animals. *Vet Pathol* 2003; 40(4):345-54.
- Kobayashi K, Mishima H, Harwood F, Hashimoto S, Toyoguchi T, Goomer R, Et Al. The Suppressive Effect Of Hyaluronan On Nitric Oxide Production And Cell Apoptosis In The Central Region Of Meniscus Following Partial Meniscectomy. *Iowa Orthop J* 2002; 22: 39-41.
- Takahashi K, Hashimoto S, Kubo T, Hirasawa Y, Lotz M, Amiel D. Hyaluronan Suppressed Nitric Oxide Production In The Meniscus And Synovium Of Rabbit Osteoarthritis Model. *J Orthop Res* 2001; 19: 500-3.
- Sheybaninia A, Valai N, Mohammad Sadeghi Sh, Azizi F. Evaluation Of Methodology In Published Articles. *Research In Medicine* 2009; Spring: 5-11.[Text In Persian]

Survey the Effect of Hyaluronic Acid Injection in the Prevention of Hip Osteonecrosis in Dog

Esmailjah A.A.(M.D.)¹- Dehghan M.(Ph. D.)²- *Okhovatpour M.A.(M.D.)¹- Zahedi A.(Ph. D.)³- Safdari F.(M.Sc.)⁴

*Corresponding Address: Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, IRAN

E- mail: okhovatpour@gmail.com

Received: 24/Aug/2010 Accepted: 31/Jan/2011

Abstract

Introduction: Femoral neck fracture following osteonecrosis is a common problem. Recently, some reports implicated the success of using hyaluronic acid (HA) in prevention of cartilaginous destruction, and the potential ability of HA in prevention of osteochondronecrosis.

Objectives: To determination the effect of intra- articular HA injection after femoral neck osteotomy

Materials and Methods: In this observational study, 20 dogs were followed after femoral neck osteotomy fixed with pins. The dogs were randomly divided in two groups. Case group received 10 cc HA and control group received 10 cc of normal saline in two doses with 1 week interval. The substances were injected into the hip joint. The dogs were sacrificed after 8 weeks; the osteochondronecrosis were investigated by MRI and pathology. Data were analyzed using Fisher's exact test and independent t test. $P < 0.05$ was considered as significant.

Results: One dog died before research completed in both groups. Osteochondronecrosis was seen in 2 dogs in case group and 5 dogs in control group ($p < 0.15$). Although there was no significant difference between two groups but HA injection decreased the incidence of osteochondronecrosis 2.2 fold ($RR = 2.2$). Positive Predictive Value(PV) and Negative Predictive Value(NPV) for MRI were 33.3% and 58.3% in diagnosis of osteonecrosis.

Conclusion: It seems that HA injection is efficient in prevention of osteochondronecrosis after femoral neck osteotomy.

Key words: Dogs/ Femoral Neck Fractures/ Hyaluronic Acid/ Injection/ Osteonecrosis/ Osteotomy

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 78, Pages: 16-20

1. Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, IRAN

۲. Faculty of veterinarian, Tehran University, Tehran, IRAN

3. Islamic Azad University of Rasht, Rasht, IRAN

4. Akhtar Hospital, Tehran, IRAN