

Diz osteoartritinde intraartiküler hyaluronik asit uygulanmasının kıkırdak iyileşmesine etkisi

(Tavşanlarda deneysel bir çalışma)

Nurzat Elmalı⁽¹⁾, M. Akif Kaygusuz⁽¹⁾, Süleyman Özen⁽²⁾, Özlem Baysal⁽³⁾, Muharrem İnan⁽¹⁾, Mustafa Karakaplan⁽⁴⁾, Ömer Şarlak⁽⁵⁾

Hyaluronik asit (HA), eklem kıkırdağı ve sinovyal sıvıda bol miktarda bulunan insan vücudunun doğal bir maddesidir. Normal eklem fonksiyonunda önemli rol oynayan HA, osteoartritte kalitatif ve kantitatif değişiklik gösterir. Bu çalışmada tavşanların diz eklemine ön çapraz bağ (ÖÇB)'in kesilmesini takiben oluşturulan dejenerasyon sürecinde intraartiküler Sodyum hyaluronik asit (NaHA) uygulanmasının eklem kıkırdağı üzerindeki etkileri araştırıldı. Bu amaçla 20 tavşanın ÖÇB'ı eksize edildi ve eksizyondan dört hafta sonra bunlardan on tanesinin diz eklemine 0.3 ml NaHA enjeksiyonu birer hafta ara ile toplam üç defa uygulandı. Diğer on tavşanın bulunduğu kontrol grubuna ise aynı protokol ile 0.3 ml SF enjeksiyonu yapıldı. Son enjeksiyonlardan dört hafta sonra tavşanlar öldürülerek eklem kıkırdakları makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirildi. Kontrol grubunda eklem kıkırdağında fissürleşme ve erozyonların geliştiği ayrıca fibröz doku elemanlarında artış olduğu gözlemlendi. İntraartiküler NaHA enjekte edilen deney grubunda ise kıkırdak hasarının hafif ve kondroblast proliferasyonunun belirgin olduğu gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: Hyaluronik asit, Sodyum hyaluronat

**The healing effect of intraarticular hyaluronic acid injection on osteoarthritic knee:
(A study on rabbit knees)**

Hyaluronic acid (HA) which exists in large amounts in synovial fluid and joint cartilage, is a naturally found substance in human body. It plays an important role in normal joint function and shows qualitative and quantitative changes in osteoarthritis. In this review, during the degeneration process, which was performed with excising of anterior cruciate ligament (ACL) of rabbits' knee joints, effects of intraarticular Sodium HA (NaHA) injection on joint cartilage is investigated. ACL of twenty rabbits were excised for this purpose and by the end of fourth week, ten of them were injected in their knees with 0.3 ml NaHA weekly and three times totally. The other ten, control group were injected with 0.3 ml saline solution with the same protocol. After four weeks by last injections, all rabbits were killed and joint cartilage were considered macroscopically and microscopically. In control group, fissuring and erosive changes of joint cartilage with an increase in fibrous tissue elements was observed. In which intraarticular NaHA injection group slight cartilage damage and evident chondroblast proliferation was observed.

Keywords: Hyaluronic acid, Sodium Hyaluronate

Hyaluronik asit (HA); eklem çevresindeki homeostazisin sürdürülmesinde önemli görevleri olan glikozaminoglikan yapıda bir polisakkarittir. Sinovyal eklemlerde kıkırdağın yüzeyel tabakaları, sinovyal sıvı, kapsül ve ligamentlerde bulunur (5, 9). Sinovyal membranın sinoviyositleri tarafından üretilen serbest haldeki HA, sinovyal sıvının viskozitesinden ve elastikiyetinden sorumludur. Kıkırdağın yüzeyel tabakalarında ise proteoglikan (PG) ve kollajen mo-

leküllerine bağlanarak hem bir lubrikan olarak etki gösterir, hem de kıkırdak ile sinovyal sıvı arasındaki metabolik alışverişlerin düzenlenmesinde yarı geçirgen bir bariyer olarak görev yapar. Kıkırdakta kondrositler, kollajen liflere yapışık HA-PG agreganları tarafından oluşturulan bir kafes yapısı ile iyi şekilde korunmuştur. Bu yapı, eklem yönelik kompresyonlarda kıkırdağın elastisite ve sertliğini sağlar (10, 13).

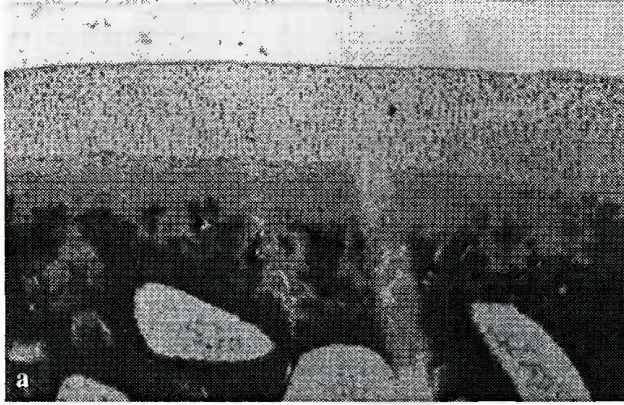
(1) İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Yrd. Doç. Dr.

(2) İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Patoloji Anabilim Dalı, Yrd. Doç. Dr.

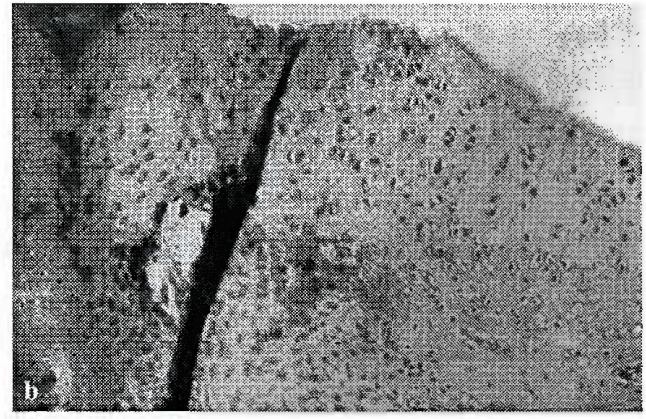
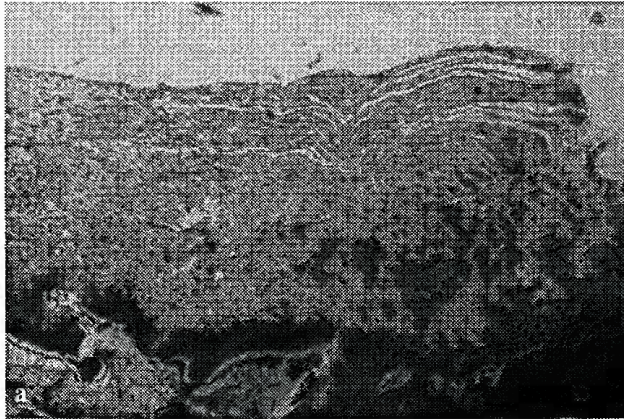
(3) İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Uzman Dr.

(4) İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi

(5) İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Prof. Dr.



Şekil 1 a, b: Normal eklem kıkırdağı



Şekil 2 a, b: SF enjekte edilen kontrol grubunda, eklem kıkırdağ yüzeylerinde pürütiklenme, yer yer parçalanma, dökülme ve fissürleşmemenin bulunduğu, fibroz elemanlarından artışla beraber, seyrek primitif mezenkimal doku görülmektedir

Osteoartritte sinovyal sıvının elastisite ve viskozitesi normal eklemlerle karşılaştırıldığında azalır. Bu azalma üç faktöre bağlıdır. Bunlar, HA moleküllerinin PG ve kollajen molekülleri ile etkileşiminde azalma, eklem sıvısında HA moleküllerinin molekül ağırlığında azalma ve sinovite bağlı effüzyonla birlikte HA konsantrasyonunda azalma. Sinovyal sıvının reolojik özelliklerindeki bu değişiklik nedeniyle HA'in intersellular matrikste koruyucu, lubrikan ve çok absorbe edici özellikleri azalır (5).

Sodyum hyaluronat (NaHA), horoz ibiğinden elde edilen, ortalama molekül ağırlığı bir milyon Da'dan büyük, fizyolojik tuzlu su içerisinde eritilmiş yüksek molekül ağırlıklı doğal, anyonik bir polisakarittir. Ekstrasellular mesafede HA' e benzer tarzda viskoelastik fonksiyon gösterir (2). Osteoartitli hastalarda HA sentezinin ve molekül yapısının tekrar eski haline getirilerek, sinovyal sıvının viskoelastik özelliğinin yeniden düzenlenmesi (viscosupplementation) amacıyla intraartikuler sodyum hyaluronat enjeksiyonları uygulanmaktadır (4, 8).

Bu deneysel çalışmadaki amacımız, tavşan diz eklemlerinde ön çapraz bağın kesilmesini takiben

erken osteoartrit gelişimi sürecinde intraartikuler NaHA uygulanmasının kıkırdağ iyileşmesi üzerindeki etkisini araştırmaktır.

Gereç ve yöntem

Çalışmamızda ağırlıkları 2000-2500 gram arasında değişen 20 adet Yeni Zelanda tipi beyaz tavşan kullanıldı. Genel anestezi Ketamine 40 mg/kg (Ketalar; 50 mg/ml) + Xylazine 5 mg/kg (Rompun; 23.2 mg/ml) aynı enjektöre çekilerek tavşanın gluteal adale kitlesine enjekte edildi. Tavşanların sağ alt ekstremiteleri aseptik koşullarda hazırlandı. Tüm tavşanların sağ diz eklemleri medial parapatellar insizyonla açıldı. Ön çapraz bağın femoral ve tibial kondil tutunma yerlerinden eksize edilmesinden sonra artrotomi yeri kapatıldı. Kontrolateral sol diz eklemlerinde ACL intakt bırakıldı. Tavşanlarda anestezi ile ilgili bir sorun olmadı. Cerrahiden hemen önce 75 mg/kg Cefradur (Sefril, 500 mg) ile tek doz enfeksiyon profilaksisi yapıldı.

Tavşanlar 10'arlı iki gruba ayrılarak kafeslerine alındı ve çalışma tamamlanuncaya kadar serbest ak-



Şekil 3: NaHa grubunda kıkırdakta hasarlanmanın hafif olduğu, fibroblastlardan kondrosit benzeri hücelere doğru kondroblastik proliferasyonun arttığı, yüzeye yakın hücrelerin oval şekilde ve sık dizildiği görülmektedir

tif harekete bırakıldı. Eklem immobilizasyonunun kıkırdak üzerinde olabilecek negatif etkisi bu şekilde önleildi. Ameliyattan dört hafta sonra 10 tavşanın sağ dizine 0.3 ml yüksek molekül ağırlıklı sodyum hyaluronat (NaHA) intraartiküler uygulandı. Bu işlem birer hafta ara ile ve toplam üç kez olacak şekilde tekrarlandı. Diğer 10 tavşanın sağ diz eklemine ise 0.3 ml serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu aynı şekilde uygulandı. Son enjeksiyondan dört hafta sonra tavşanlar intravenöz verilen pentotal sodyum (Thiopentane 1 gr) (100 mg/kg/vücut ağırlığı) ile öldürüldü. Tüm tavşanların sağ alt ekstremiteleri sakrifiye edilerek diz eklem kıkırdağı makroskopik olarak incelendi. Femur distal kondilleri testere ile osteotomize edildi. Alınan örnekler % 10 nötral tampona formalin içerisinde bir hafta tespit edildikten sonra % 45 formik asit ve %20 sodyum sitratın eşit miktarları kullanılarak üç gün dekalsifikasyona bırakıldı. Dekalsifikasyonu takiben yük taşıyan yüzeyden kıkırdak ve subkondral kemiği içerecek şekilde rotasyonel mikrotom ile 5 mikrometrelik kesitler halinde blok kesitler alındı. Doku bloklarının parafinle işleminden sonra hemotoxylin-eozin ile boyanarak hücresel yapının histolojik görünümü değerlendirildi.

Bulgular

Tüm tavşanlar 10 haftalık çalışma süresinin tamamladılar. Artrotomi yaraları sorunsuz iyileşti. Hiçbir tavşanda enfeksiyon görülmedi. Çalışmanın tamamlanmasından sonra 20 tavşanın diz eklemleri orijinal insizyon yerinden geçilerek açığa çıkarıldı. Diz eklemlerinin muayenesinde her iki grup makroskopik ve histolojik görünümleri bakımından değerlendirildi.

Makroskopik muayenede eklem kıkırdağı, eklem

kapsülü, meniskal dokular ve diğer eklem yapılarında önemli bir değişiklik saptanmadı. Histopatolojik muayenede normal kıkırdak doku (Şekil 1) ile karşılaştırıldığında SF enjekte edilen kontrol grubunda, eklem kıkırdak yüzeylerinde pürütülenme, yer yer parçalanma, dökülme ve fissürleşmenin bulunduğu, fibroz doku elemanlarında artışla beraber, hücrelerin seyrek dizildiği ve yuvarlak olduğu görülürken (Şekil 2), NaHA grubunda kıkırdakta hasarlanmanın hafif olduğu, fibroblastlardan kondrosit benzeri hücelere doğru kondroblastik proliferasyonun arttığı, yüzeye yakın hücrelerin oval şekilde ve sık dizildiği görüldü (Şekil 3).

Tartışma

Bu deneysel çalışmada eklem kıkırdağının mekanik yaralanmasında bir biyopolimer olan intraartiküler NaHA enjeksiyonunun kıkırdak üzerinde koruyucu etkinliğinin olup olmadığını araştırdık.

Sinovyal sıvının elastoviskozitesi tamamen içerdiği hyaluronik asite bağlıdır. Osteoartritte sinovyal sıvının elastisite ve viskozitesi normal eklemlerden daha düşüktür. Osteoartritte HA moleküllerinin hem sayısı azalır, hem de eksudasyon sonucu konsantrasyonu azalır. Sinovyal sıvıdaki bu değişiklikler nedeniyle HA in intersellular matrikste koruyucu, lubrikan, şok abzorbe edici ve moleküllerin geçişi için bariyer özelliği azalır. İntersellular matriksdeki ve hücre fonksiyonlarındaki değişiklik eklemdaki patolojik değişikliklerin başlamasından sorumludur. Matriksin lubrikan ve koruyucu etkisinin yokluğunda eklem hareketinin neden olduğu makaslama kuvvetleri sinovyal doku ve kıkırdak yüzeyinde kollajen şebekesinin bozulmasına ve fibrillasyona neden olur. Eklem hareketi sırasında sinovyal membranın gerilmesi hyaluronik asit üreten hücrele-

ri hasarlayabilir. Azalan moleküler bariyer ve sıvı volumündeki artış intersellular matrikse geçen metalitlerin aktivitesini ve hareketini etkiler.

Viskosuplementasyon fikri; sinovyal sıvı, sinovyal doku ve lamina splendensların normal reolojik ortamını yeniden düzenleyerek, eklem kıkırdağının lubrikan, koruyucu, şok abzorbe edici ve bariyer özelliklerini yeniden kurar. Sinovyal sıvının normal elastoviskozitesinin kazanılması ile normal doku rejenerasyonu ve fonksiyonu meydana gelebilir (2).

İntraartikuler NaHA enjeksiyonları veterinerlikte ve özellikle yarış atlarının daha yüksek performans göstermesi amacıyla 1960 lardan bugüne kadar kullanılmaktadır. 1980 li yıllardan sonra insanlarda dejeneratif eklem hastalıklarında özellikle diz eklemde uygulanmaktadır. Diz eklemi için 1'er hafta aryla 3 kez enjekte edilir. Hastaların yaklaşık %80' inde ağrılarında 6-12 ay süre ile geçici bir iyileşme görülür. Bilinen kontrendikasyonu yoktur, hastalar tarafından iyi tolere edilir. Yan etki ve allerjik reaksiyon görülmesi nadir ve hafiftir(6, 14).

Buna karşılık, osteoartritin tedavisinde sıklıkla kullanılan nonsteroidal antienflamatuvar ilaçlar veya kortikosteroidlerin ağrıyı azaltmalarına rağmen proteoglikan sentez hızını azalttıkları ve böylece kıkırdakta hasarlanmaya neden oldukları bilinmektedir (11).

Hayvan çalışmalarında ekzojen NaHA enjeksiyonundan sonra sinovyal sıvı viskozitesinin yaklaşık 20 günde arttığı gösterilmiştir. Sinovyal sıvıdan atılma hızı enjekte edilen NaHA'in eklemdeki total endojen HA miktarına oranına bağlıdır. Enjekte edilen NaHA miktarı arttıkça atılma hızı da artar. "Viscosupplementation" tedavisinin HA 'in atılma hızını bloke etmediği ve eklemde ekzojen HA birikimine neden olmadığı gösterilmiştir. Bu yüzden NaHA ile artrit eklemdeki düşük HA konsantrasyonu normal seviyelere yeniden getirilir. Ekzojen HA'in sinovyal membran hücrelerinde endojen HA sentezini stimüle ettiği, böylece proteolitik enzimlere karşı matriks bütünlüğünün korunmasını sağladığı ve kondrositlerin anabolik davranışlarını hızlandırdığı iddia edilmektedir (1, 7).

İntraartikuler uygulanan NaHA 'in endojen HA sentezini stimüle ederek sinovyal sıvının viskoelastik özelliklerini iyileştirdiği hayvan deneylerinde gösterilmiş olmasına rağmen diz osteoartritin ilerlemesini değiştirdiğine dair bulgu yoktur (3). Yine bu uygulamanın uzun dönem etkileri bakımından yeterli bilgi yoktur (12).

Biz, makroskopik olarak NaHA enjekte edilen ve SF enjekte edilen dizler arasında farklılık görmedik ancak histolojik muayenede SF enjekte edilen gruba göre NaHA enjekte edilen grupta kıkırdak hücrelerinin şekli, dizilimi ve proliferasyonu bakımından normal eklem kıkırdağına benzer görünüm tespit ettik. Çalışmamızdaki kısa süreli gözlemlerimizde ileri derecede dejeneratif değişikliklerin olmadığı osteoartritin erken dönemlerinde intraartikuler NaHA uygulanmasının kondroprotektif etkisi olduğu yönündedir.

Kaynaklar

1. Asari A, Miyauchi S, Matsuzaka S, Ito T, Kominami E, Uchiyama Y: Molecular weight-dependent effects of hyaluronate on the arthritic synovium. *Arch Histol Cytol* 61(2):125-35, 1998.
2. Balazs E, Denlinger JL: Viscosupplementation: A new concept in the treatment of osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology* 20 (39): 3-8, 1993,
3. Bassleer C, Henrotin Y, Franchimont P: In-vitro evaluation of drugs proposed as chondroprotective agents. *Int J Tissue React* 14: 231-241, 1992.
4. Bragantini A, Molinaroli F: A pilot clinical evaluation of the treatment of hip osteoarthritis with hyaluronic acid. *Current Therapeutic Research* 66 (3) 319-330, 1994.
5. Bray RC, Franck CB, Miniaci A. The structure and function of diarthroidal joints. *Operative Arthroscopy* Ed. McGinty Lippincot-Raven, Philadelphia-NewYork, 105-145, 1996.
6. Dahlberg L, Lohmander LS, Ryd L: Intraarticular injections of hyaluronan in patients with cartilage abnormalities and knee pain. A one-year double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* 37 (4): 521-8, 1994.
7. Gingerich DA, Auer JA, Fackerman GE: Force plate studies on the effect of exogenous hyaluronic acid on joint function in equine arthritis. *J Vet Pharmacol Ther* 2: 291-8, 1979.
8. Lussier A, Cividino AA, McFarlane CA, Olszynski WP, Potashner WJ, De Medicis R. Viscosupplementation with hylan for the treatment of osteoarthritis: findings from clinical practice in Canada. *J Rheumatol* 23(9): 1579-85, 1996.
9. Radin EL, Paul IL, Swann DA: And Schottsteadt E.S. "Lubrication of Synovial Membrane." *Ann Rheum Dis* 30:322, 1971.
10. Schwann DA, Radin EL, Nazimiec M, Weisser PA, Curran N, Lewinnek G. Role of hyaluronic acid in joint lubrication. *Annals of the Rheumatic Diseases* 33: 318-26, 1974.
11. Setnikar I: Antireactive properties of "chondroprotective" drugs. *Int J Tissue React* 14(5): 253-261, 1992.
12. Shimizu C, Yoshioka M, Coutts RD, Harwood FL, Kubo T, Hirasawa Y, Amiel D: Long-term effects of hyaluronan on experimental osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage* 6(1):1-9, 1998.
13. Smith MM, Ghosh P: The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. *Rheumatol Int* (7): 113-122, 1987.

14. Towheed, TE, Hochberg, MC: A systematic review of randomized controlled trials of pharmacological therapy in osteoarthritis of the knee, with an emphasis on trial methodology. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 26(5): 755-770, 1997.

Yazışma adresi:

Yrd. Doç. Dr. Nurzat Elmalı

Zafer Mahallesi Eczacılar Sitesi B-19

44300 Malatya, Türkiye

Tel: (0422) 321 28 48, Fax: (0422) 341 0610