



Kalça cerrahisi sonrası heterotopik ossifikasyon incelemesi için yeni bir küçük hayvan modeli

Joris ANTHONISSEN, Christian OSSENDORF, Johanna Lisa HOCK,
Ulrike RITZ, Alexander HOFMANN, Pol Maria ROMMENS

Mainz Üniversite Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, Mainz, Rheinland-Pfalz, Almanya

Amaç: Heterotopik ossifikasyon (HO)–yumuşak dokularda kemik oluşumu–pelvis ve kalça cerrahisi sonrası sık görülen bir sorundur ama temelinde yatan patojenik mekanizmalar hakkında çok az bilinmektedir. Heterotopik ossifikasyona karşı yöneltilen yeni profilaktik tedavi rejimlerini değerlendirmek ve geliştirmek için hayvan modellerinde temelde yatan patojenleri irdelemek önemlidir. Ancak, HO için önceden geliştirilen küçük hayvan modelleri potansiyel olarak HO'ya sebep olan cerrahi ya da travma mekanizmalarını örnek almamıştır. Dolayısıyla, bu çalışmanın amacı eksiksiz bir biçimde HO'ya yol açabilecek bir kalça cerrahisini taklit eden yeni bir küçük hayvan modeli geliştirmektir.

Çalışma planı: Yirmi erkek Wistar sıçan, üç adımda femoral kanal 2 mm'ye kadar delinen ve kas lezyonu oluşturulan bir sağ kalça cerrahisine tabi tutuldu. Operasyondan 12 hafta sonra mikro-bilgisayarlı tomografi kullanılarak heterotopik kemik miktarı değerlendirildi.

Bulgular: Yirmi hayvanın 18'inde, operasyondan 12 hafta sonra kalça çevresinde HO görüldü. Heterotopik kemik miktarı çok küçük parçacıklardan neredeyse ankiloz seviyesine kadar değişkenlik gösterdi.

Çıkarımlar: Ekzojen osteojenik uyarıcı kullanmayan ve eksiksiz bir biçimde HO'ya yol açan kalça/pelvik cerrahisi bir sıçan modeli üzerinde geliştirildi.

Anahtar sözcükler: Endoprotez; hayvan modeli; heterotopik ossifikasyon; kalça; patojen.

Heterotopik ossifikasyon (HO) –yumuşak dokularda ektopik kemik oluşumu– ağrı ve hareket alanında küçülmeye yol açan ve genellikle yaşam kalitesinde bozulmaya sebep olan muskuloskeletal bir bozukluktur.^[1,2] Edinilmiş HO neredeyse herhangi bir muskuloskeletal travma ya da operasyon sonrasında ortaya çıkabilir.^[3] Ortopedik cerrahi ya da travmayı takiben HO oluşumu yaygın olarak kalça, diz, omuz ve dirsek eklemleri çevresinde görülmektedir.^[4–8] Yüksek riskli hastalarda HO'yu önlemek için indometazin, selekoksibin ve radyasyon genellikle tedavi seçenekleri olarak kabul edilmektedir.

^[2,5,9] Heterotopik ossifikasyonda tedavisel seçenekler kısıtlı olmakla birlikte yüksek oranda tekrarlama oranına sahiptir. Son yıllarda, cerrahi rezeksiyon ve radyasyon terapisi HO'nun tekrarlanmasını önlemek için en yaygın kullanılan tedavi yöntemleri olmuştur.^[10]

Edinilmiş HO'yu araştırmak ve bu hastalığın temelinde yatan patojenik mekanizmaların iç yüzünü anlamak için bugüne kadar birçok hayvan modeli geliştirilmiştir.^[11–15] Ancak, en yaygın kullanılan modeller (örneğin, farelerin Aşil tendonunu kesmek) insanlarda HO'ya sebep olan potansiyel travma ya da cerrahi me-

Yazışma adresi: Dr. Joris Anthonissen, University Hospital Mainz, Department of Orthopaedics and Traumatology, Mainz, Rheinland-Pfalz, Germany.

Tel: +49 (0) 6131 17 23 59 e-posta: anthonissenjoris@gmail.com

Başvuru tarihi: 31.07.2014 **Kabul tarihi:** 15.11.2014

©2015 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği

Bu yazının çevrimiçi İngilizce versiyonu
www.aott.org.tr adresinde
doi: 10.3944/AOTT.2015.14.0271
Karekod (Quick Response Code)



kanizmaları taklit etmemektedir ve dolayısıyla, insanlardaki duruma olan uygunlukları ve sonuç olarak insanlara uygulanabilirlikleri halen belirsizliğini korumaktadır.^[16-20] Güvenilir profilaksi ya da uygun bir tedavi olmadığı için hayvan modelleri HO araştırmasında aynen kalacak ve hatta büyük önem kazanacaktır.^[5] Uygun bir profilaktik rejim geliştirmek için HO patojeni daha iyi anlaşılmalıdır ve konu ile alakalı modellerin HO patojenini inceleme konusundaki yetersizliği yeni hayvan modelleri geliştirmeyi gerekli kılmıştır.^[11] Şu anki en uygun model Schneider modelidir. Ancak, bu model oldukça komplikedir ve dolayısıyla kurması zordur.^[21,22] Ayrıca, küçük hayvanlar yerine tavşan kullanımı bu modeli daha zahmetli hale getirmektedir.

Bu çalışmanın amacı, kalça/pelvik cerrahisi sonrasında edinilen HO için küçük hayvan modeli oluşturmaktır. Bu modelin amacı kalça ve pelvik cerrahisi koşullarını ve sonrasında HO patojenini canlandırmaktır.^[15] Bu tür bir modele duyulan ihtiyaç daha önce belirtilmişti.^[11,15,21] Heterotopik ossifikasyon sıklıkla kalça cerrahisi sonrasında görüldüğü ve bir kırığın ya da artrit cerrahi onarımı sonrası mobilite ve yaşam kalitesini ciddi bir şekilde düşürdüğü için^[8,23,24] kalça çevresindeki HO için mevcut Schneider modelini değiştirmek/basitleştirmek ve bunu

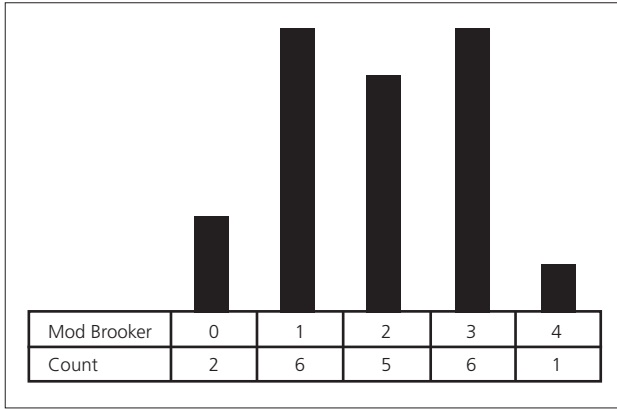
araştırma başvurularında daha makul olan sıçanlarda uygulamak uygun görüldü. Bu modelin HO'yu güvenilir olarak oluşturacağı, kullanmak için kolay olacağı, HO patojenini araştırmayı kolaylaştıracağı ve bir profilaktik rejimin araştırılmasına olanak sağlayacağı varsayımında bulunduk.

Gereç ve yöntem

Vücut ağırlıkları 287–365 arasında değişen yirmi erkek Wistar sıçan (Charles River, Cologne, Germany) sağ kalça cerrahi müdahalesine tabi tutuldular. On iki saatlik aydınlık-karanlık döngü ve 21 derecelik sabit ısıyla ve sınırsız su ve kuru mama erişimi ile standart kafeslerde tutuldular. Hayvan bakımı ve yönetimi ile birlikte cerrahi protokol ve operasyon yerel etik komitesi tarafından onaylandı. (çalışma no: 23 177-07/G13-1-047). Lisanslı, deneyimli bir veteriner hayvan bakımı ve cerrahi operasyonu denetledi. Anestezi, induksiyon için izofloran (Florane®; Baxter, Deerfield, IL, USA) inhalasyonu ile uygulandı ve subkütan medetomidin (Dorbene®; Pfizer, New York, NY, USA) (0.375 mg/kg), midazolam midazolam (Dormicum®; Roche, Basel, Switzerland) (4 mg/kg) ve fentanil (Fentanyl-Janssen®; Johnson and Johnson, New Brunswick, NJ, USA)



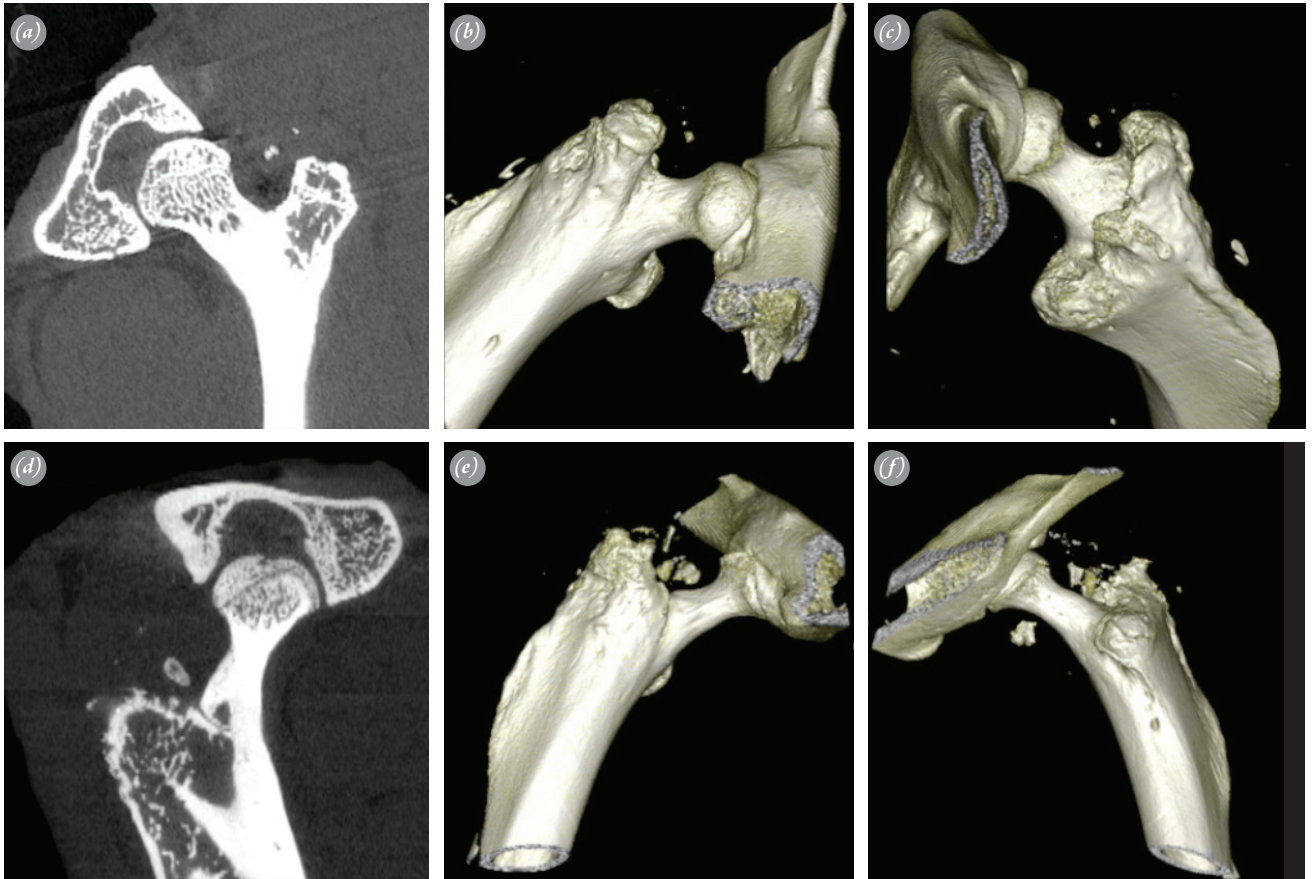
Şekil 1. (a) Sol tarafına yatan ve sağ büyük trokanter ve işaretli insizyonun intraoperatif görüntüsü. (b) En büyük kası ayıran ve büyük trokanteri açıkta bırakan deri insizyonu sonrası intraoperatif görüntü. (c) Medüler kanala girdikten sonra matkap ucu kullanılarak oluşturulan femurdaki deliğin intraoperatif görüntüsü. (d) Klempleme sonrası en büyük kasın kapatılma anındaki intraoperatif görüntü. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]



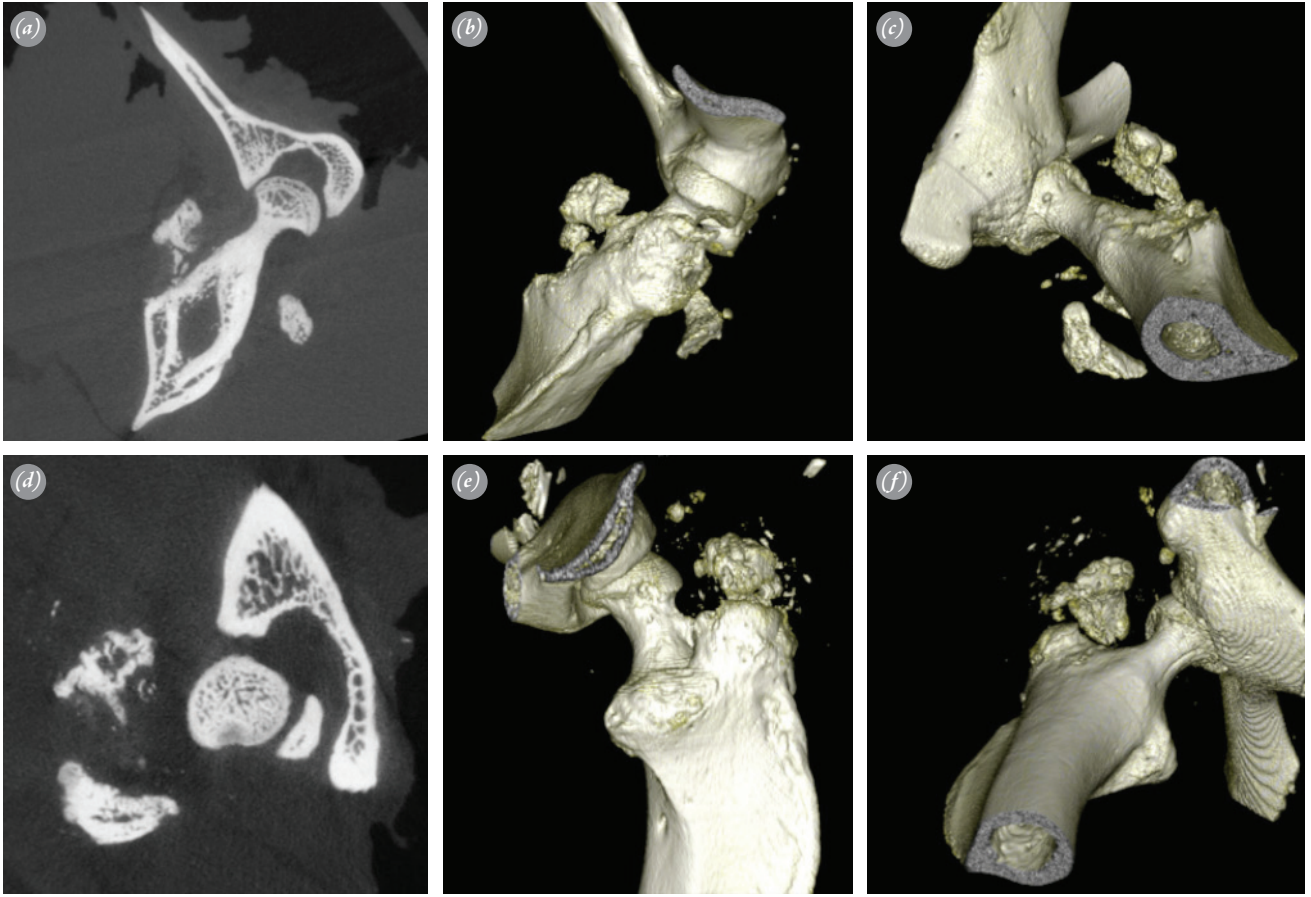
Şekil 2. Farklı hayvanlardaki heterotopik ossifikasyon derecesi. (Değiştirilmiş Brooker sınıflandırmasına göre) heterotopik ossifikasyon derecesi x-eksisinde ve hayvanların sayısı da y-eksisinde görülmekte.

(0.005 mg/kg) enjeksiyonu ile devam etti. Operasyon sonunda anestezi subkütan atipamezol (Antisedan®; Pfizer, New York, NY, USA) (1 mg/kg) ile geriye çevrildi. Hayvanlar, ameliyat masasında sol tarafları üzerinde

yatacak şekilde konumlandırıldı. Sağ arka ayak steril bir şekilde tıraş edildi, hazırlandı ve sarıldı (Şekil 1a). Büyük trokanter üzerinde 1.5 mm'lik bir insizyon yapıldı ve kası lifleri doğrultusunda ayırarak şekilde keskin bir diseksiyon en büyük kas içinden kemiğe kadar yapıldı (Şekil 1b). Trokanter açığa çıktıktan sonra büyük trokanterin ucuna mediyal, medüller kanala girişi sağlamak için 1 mm'lik uçlu elektrikli matkap kullanıldı. Femurda kırık oluşmamasını sağlarken femoral kanal 2 mm'ye varan delme makinası ile aşamalı olarak el ile delindi (Şekil 1c). Delik kalıntısını, cerrahi yaranın içinde oluştuğu yerde tutmak için yara suyuyla temizlenmedi. Önceden özetlenen operasyona dâhil olarak, retraktörler dolayısıyla oluşan kas travmasını güdülemek için femoral delikten sonra üç dakikalığına iki Kocher pensi en büyük kas ve medius kaslarından çaprazlama (0.5 cm'lik eşkenar üçgen oluşturacak şekilde uçları birbirine değen) yerleştirildi. Penslerin çıkarılmasından sonra, yara katmanlar halinde kapatıldı (Şekil 1d). İçme suyuna tramadol (0.5 mg/ml) eklenerek ameliyat sonrası analjezi



Şekil 3. Birinci derece heterotopik ossifikasyonlu sıçanın μ CT görüntüsü. (a) Birinci derece heterotopik ossifikasyonlu bir sıçanın kalçasının natif μ CT görüntüsü; (b ve c) aynı sıçanın μ CT görüntüsünün 3D rekonstrüksiyonu. İkinci derece heterotopik ossifikasyonlu sıçanın μ CT görüntüsü (d) ikinci derece heterotopik ossifikasyonlu sıçanın kalçasının natif μ CT görüntüsü; (e ve f) aynı sıçanın 3D μ CT görüntüsünün 3D rekonstrüksiyonu. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]



Şekil 4. Üçüncü derece heterotopik ossifikasyonlu bir sıçanın μ CT görüntüsü. **(a)** Üçüncü derece heterotopik ossifikasyonlu bir sıçanın kalçasının natif μ CT görüntüsü; **(b ve c)** aynı sıçanın μ CT görüntüsünün 3D rekonstrüksiyonu (femur boynun her bir tarafında büyük kemikçikler görülebilir). Dördüncü derece heterotopik ossifikasyonlu bir sıçanın μ CT görüntüsü. **(d)** Dördüncü derece HO'lu bir sıçanın kalçasının natif μ CT görüntüsü; **(e ve f)** aynı sıçanın μ CT görüntüsünün 3D rekonstrüksiyonu. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

sağlandı ama anti-inflamatuvar ajanlar kullanılmadı. Hayvanlara istenildiği kadar gezme izni verildi.

On iki hafta sonra, hayvanlara CO_2 inhalasyonu ile ötanazi yapıldı. Femurun proksimal yarısı ile sağ kalça ve çevreleyen yumuşak doku ile birlikte pelvik kemiğin yaklaşık yarısı rezekte edildi ve çıkarıldı, paraformaldehit içine yerleştirildi ve μ CT-40 tarayıcı kullanılarak mikro-bilgisayarlı tomografi (μ CT) analizine tabi tutuldu. Veriler, değiştirilmiş Brooker sınıflama sistemi kullanılarak analiz edildi. Kalça çevresinde gözlemlenen heterotopik kemiğe bir derece (0-V) verildi. 0 derecesi, HO bulunmadığında; I. derecesi, heterotopik kemiğin çok küçük parçacıkları (hepsi <1 mm) görüldüğünde; II derecesi 1–2 mm'lik parçacıklar görüldüğünde; III derecesi 2 mm'den büyük parçacıklar görüldüğünde; IV derecesi neredeyse ankiloz (ana kırıklarda 3 mm'den büyük açıklık bırakan –i.e. trakanter– heterotopik kemik ve heterotopik kemik-asetabulum); ve V derecesi femurun pelvise total ankilozuna verildi.

Bulgular

Bütün hayvanlar operasyonu atlattı; ameliyat sonrası olarak hemen gezmeye başladılar ve üç gün sonrasında normal mobilitayı geri kazandılar. Hazırlanan numunenin μ CT sonucu iki hayvanda HO göstermedi. Diğer hayvanların hepsinde, farklı derecelerde HO görüldü (Şekil 2); altı hayvan I. derece (Şekil 3a-c), beşi II. derece (Şekil 3d-f), altısı III. derece (Şekil 4a-c) ve biri IV. derece (Şekil 4d-f) HO gösterirken total ankiloz (V. derece) hiçbir hayvanda gözlemlenmedi.

Tartışma

Bu çalışmanın amacı, ekzojen osteojenik uyarıcı eklemesi yapılmadan eksiksiz bir biçimde HO'ya yol açabilen yeni bir hayvan modeli geliştirmektir. Bizim modelimizde 12. haftada, μ CT ile kanıtlandığı gibi yirmi sıçanın 18'i HO gösterdi. Bu bulgu, modelin ekzojen uyarıcılar olmaksızın güvenilir bir şekilde HO'ya yol açma yeterliğini kanıtladı. Sıçanlarda benzer bir modelin

gerçekleştirildiği Toom ve ark.nın daha eski bir girişimi, bir kemik morfogenetik protein içeren matris eklemesi olmadan HO gelişimini göstermeyi başaramadı. Onların bu sonucu muhtemelen ötanazi için sınırlı ameliyat sonrası süre (üç hafta) tanımlarından kaynaklanmıştı.^[25] Ekzojen uyarıcı olmayan iki homolog HO modeli daha önce geliştirildi: yukarıda adı geçen ve tavşanların kullanıldığı Schneider modeli ve Tannous'un ekstremitte blast ampütasyonu. Bu model, ekstremitte blast ampütasyonu sonrası oldukça nadir görülen HO durumunun mükemmel bir modelidir.^[15,21] Küçük hayvanlar yerine (intube edilmesi ve femuru delmek için gevşetilmesi gereken ve muhafazası daha zor ve pahalı olan) tavşanların kullanılmasından ötürü Schneider modeli zorludur.

Schneider modeli tarafından belirtilen HO oluşumu muhtemelen kemik iliğinden mezodermal kök hücrelerin kemik hücrelerine ayrıldığı hasarlı kasa transfer edilen osteojenik molekülere bağlıdır.^[26-28] Hangi moleküllerin HO'ya sebep olduğunu ve kırık iyileşmesini veya kemik büyümesini tehlikeye atmadan bunun nasıl etkileleneceğini belirlemek için daha fazla araştırma gerekmektedir. Sonuç olarak, ekzojen osteojenik uyarıcı kullanımına gerek duymayan ve 12 hafta sonrasında eksiksiz bir şekilde HO'ya yol açabilen bir kalça cerrahisi modeli sıçanlarda geliştirildi. Bu model, HO temelinde yatan patojenik süreçleri araştırmak için ileride yapılacak değerlendirmeleri desteklemektedir.

Çıkar örtüşmesi: Çıkar örtüşmesi bulunmadığı belirtilmiştir.

Kaynaklar

1. McCarthy EF, Sundaram M. Heterotopic ossification: a review. *Skeletal Radiol* 2005;34:609-19.
2. Vanden Bossche L, Vanderstraeten G. Heterotopic ossification: a review. *J Rehabil Med* 2005;37:129-36.
3. Shehab D, Elgazzar AH, Collier BD. Heterotopic ossification. *J Nucl Med* 2002;43:346-53.
4. Rommens PM, Broos PL, Vanderschot P. Preparation and technique for surgical treatment of 225 acetabulum fractures. 2 year results of 175 cases. [Article in German] *Unfallchirurg* 1997;100:338-48.
5. Baird EO, Kang QK. Prophylaxis of heterotopic ossification - an updated review. *J Orthop Surg Res* 2009;4:12.
6. Griffin SM, Sims SH, Karunakar MA, Seymour R, Haines N. Heterotopic ossification rates after acetabular fracture surgery are unchanged without indomethacin prophylaxis. *Clin Orthop Relat Res* 2013;471:2776-82.
7. Ahrengart L. Periarticular heterotopic ossification after total hip arthroplasty. Risk factors and consequences. *Clin Orthop Relat Res* 1991;263:49-58.
8. Brooker AF, Bowerman JW, Robinson RA, Riley LH Jr. Ectopic ossification following total hip replacement. Incidence and a method of classification. *J Bone Joint Surg Am* 1973;55:1629-32.
9. Ritter MA, Sieber JM. Prophylactic indomethacin for the prevention of heterotopic bone formation following total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 1985;196:217-25.
10. Stover SL, Niemann KM, Tulloss JR. Experience with surgical resection of heterotopic bone in spinal cord injury patients. *Clin Orthop Relat Res* 1991;263:71-7.
11. Kan L, Kessler JA. Animal models of typical heterotopic ossification. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:309287.
12. McClure J. The effect of diphosphonates on heterotopic ossification in regenerating Achilles tendon of the mouse. *J Pathol* 1983;139:419-30.
13. Michelsson JE, Granroth G, Andersson LC. Myositis ossificans following forcible manipulation of the leg. A rabbit model for the study of heterotopic bone formation. *J Bone Joint Surg Am* 1980;62:811-5.
14. Volek-Smith H, Urist MR. Recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP) induced heterotopic bone development in vivo and in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996;211:265-72.
15. Tannous O, Griffith C, O'Toole RV, Pellegrini VD Jr. Heterotopic ossification after extremity blast amputation in a Sprague-Dawley rat animal model. *J Orthop Trauma* 2011;25:506-10.
16. Hannallah D, Peng H, Young B, Usas A, Gearhart B, Huard J. Retroviral delivery of Noggin inhibits the formation of heterotopic ossification induced by BMP-4, demineralized bone matrix, and trauma in an animal model. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A:80-91.
17. Moed BR, Resnick RB, Fakhouri AJ, Nallamothe B, Wagner RA. Effect of two nonsteroidal antiinflammatory drugs on heterotopic bone formation in a rabbit model. *J Arthroplasty* 1994;9:81-7.
18. Murat N, Hocaoglu N, Karatosun V, Yorukoglu K, Gidener S, Gunal I. The effects of non-selective and cyclooxygenase-2-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs on heterotopic ossification in rats. *Med Sci Monit* 2005;11:BR449-51.
19. Vanden Bossche LC, Van Maele G, Wojtowicz I, Bru I, Decorte T, De Muyneck M, et al. Free radical scavengers versus methylprednisolone in the prevention of experimentally induced heterotopic ossification. *J Orthop Res* 2009;27:748-51.
20. Anthonissen J, Ossendorf C, Ritz U, Hofmann A, Rommens PM. Animal models for acquired heterotopic ossification. *Acta Orthop Belg* 2014;80:2-10.
21. Schneider DJ, Moulton MJ, Singapuri K, Chinchilli V, Deol GS, Krenitsky G, et al. The Frank Stinchfield Award. Inhibition of heterotopic ossification with radiation therapy in an animal model. *Clin Orthop Relat Res* 1998;355:35-46.

22. Tannous O, Stall AC, Griffith C, Donaldson CT, Castellani RJ Jr, Pellegrini VD Jr. Heterotopic bone formation about the hip undergoes endochondral ossification: a rabbit model. *Clin Orthop Relat Res* 2013;471:1584–92.
23. Ritter MA, Vaughan RB. Ectopic ossification after total hip arthroplasty. Predisposing factors, frequency, and effect on results. *J Bone Joint Surg Am* 1977;59:345–51.
24. Thomas BJ. Heterotopic bone formation after total hip arthroplasty. *Orthop Clin North Am* 1992;23:347–58.
25. Toom A, Suutre S, Märtson A, Haviko T, Selstam G, Arend A. Lack of a central role for osteoprogenitor cells from the femoral canal in heterotopic ossification of the hip: an experimental study in a rat model. *J Bone Joint Surg Br* 2010;92:298–303.
26. Pape HC, Marsh S, Morley JR, Krettek C, Giannoudis PV. Current concepts in the development of heterotopic ossification. *J Bone Joint Surg Br* 2004;86:783–7.
27. Nauth A, Giles E, Potter BK, Nesti LJ, O'Brien FP, Bosse MJ, et al. Heterotopic ossification in orthopaedic trauma. *J Orthop Trauma* 2012;26:684–8.
28. Lin L, Shen Q, Xue T, Yu C. Heterotopic ossification induced by Achilles tenotomy via endochondral bone formation: expression of bone and cartilage related genes. *Bone* 2010;46:425–31.