



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

ERKEN DÖNEM DENEYSEL OSTEOARTRİT MODELİNDE
İNTRAARTİKÜLER UYGULANAN STATİNİN KONDROPROTEKTİF
ETKİLERİNİN ELEKTRON MİKROSKOP ALTINDA ARAŞTIRILMASI

Dr. Sarp BAYYURT

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2012



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERKEN DÖNEM DENEYSEL OSTEOARTRİT MODELİNDE
İNTRAARTİKÜLER UYGULANAN STATİNİN KONDROPROTEKTİF
ETKİLERİNİN ELEKTRON MİKROSKOP ALTINDA ARAŞTIRILMASI**

Dr. Sarp BAYYURT

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Ömer Faruk BİLGEN

BURSA-2012

İÇİNDEKİLER

Özet	i
İngilizce Özet	iii
Giriş	1
Eklem Kıkırdağı.....	3
Eklem Kıkırdak Tabakaları.....	3
Yüzeyel tabaka	4
Orta Tabaka	4
Derin Tabaka	5
Kalsifiye Tabaka	5
Ekstrasellüler Matriks-Kondrosit	5
Matriksmetaloproteinazlar	8
Osteoartrit Patofizyolojisi	9
Statinler (3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzimA redüktaz inhibitörleri)	11
Gereç Yöntem	14
Cerrahi Teknik	14
Histopatolojik Değerlendirme	17
Doku Hazırlanması	19
Bulgular.....	21
Makroskopik Bulgular.....	21
Işık Mikroskopik Bulgular	23
Elektron Mikroskopik Bulgular.....	33
Tartışma ve Sonuç.....	35

ÖZET

Bu çalışmada tavşanlarda geliştirilen erken dönem deneysel osteoartrit (OA) modelinde intraartiküler uygulanan statinin (atorvastatinin), kıkırdak dokusu üzerindeki kondroprotektif etkilerini ışık ve elektron mikroskopları ile inceleyip hücre içindeki ve dışındaki değişiklikleri değerlendirmeyi amaçladık.

20 tavşan osteoartrit oluşturmak için ön çapraz bağları kesilerek iki gruba ayrıldı. Kontrol grubuna serum fizyolojik, deney grubuna atorvastatin intraartiküler olarak birer hafta ile üç kez uygulandı. Tavşanlar 12. haftada sakrifiye edilerek diz eklemi kıkırdak dokusu makroskopik, histopatolojik ve hücresel düzeyde elektron mikroskopik olarak değerlendirildi. Diz eklemi medial kompartmanı kıkırdak dokusunun lezyonlarının histolojik ve histokimyasal evrelemesinde Mankin derecelendirme sistemi, makroskopik evrelemesinde ise Pelletier sistemi kullanıldı. Makroskopik ve histopatolojik sonuçlar istatistiksel olarak gruplar arasında karşılaştırıldı.

Femur medial kondilinde gelişen lezyonların değerlendirilmesiyle elde edilen toplam puan kontrol grubunda ortalama 11.33 ± 0.667 , deney grubunda 1.5 ± 0.687 iken, tibia medial plato kıkırdak dokuda gelişen lezyonların değerlendirilmesiyle elde edilen toplam puan kontrol grubunda ortalama 11.56 ± 0.709 , deney grubunda ise 1.40 ± 0.618 olarak tespit edildi. Femur medial kondil ve tibia medial plato kıkırdak dokusu için elde edilen puanlar gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, kontrol grubu ile deney grubu arasında anlamlı fark saptandı ($p < 0,05$). Deney grubu ile kontrol grubunun makroskopik sonuçları da istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0,05$).

Çalışmamızda kıkırdak dokunun orta tabakasında yapılan elektron mikroskopik değerlendirmede, deney grubunda hücresel düzeyde sağlam kıkırdak dokusuyla uyumlu kondrosit ve matriks yapısı olduğu, perisellüler hale görünümü olmadığı, golgi kompleksi ve endoplazmik retikulumun yapısının bozulmadığı gözlemlendi. Kontrol grubunda ise piknotik çekirdekler,

düzensiz kollajen lifler, değerlendirilen kesitlerde kondrositlerin etrafında perisellüler hale görünümü, endoplazmik retikulumda sakküler yapılar olduğu ve golgi kompleksinin görülmediği tespit edildi.

Sonuç olarak deneysel osteoartrit modelinde kıkırdak dokunun makroskopik, ışık ve elektron mikroskopik değerlendirmesinde, statinin kıkırdak dokudaki kondroprotektif etkisinin varlığını tespit ettik. Elektron mikroskopik olarak hücresel düzeyde elde ettiğimiz bulgulara göre; statinin kondroprotektif etkisinin endoplazmik retikulum ve golgi kompleksinin yapısını koruyarak, proteoglikanların yapımı ve salınımının devamlılığını yaparak sağladığı kanısındayız.

Anahtar kelimeler: Statin, Deneysel osteoartrit, Kondroprotektif etki, Elektron mikroskop

SUMMARY

The Chondroprotective Effects Of Intra-Articular Application Of Statin On Early Stage Experimental Osteoarthritis Evaluated By Electron Microscope

This study of early stage osteoarthritis developed in an experimental rabbit model, aimed to evaluate the chondroprotective effects of intra-articularly applied atorvastatin on cartilage tissue by examining intracellular and extracellular changes.

Osteoarthritis was created by cutting the anterior cruciate ligament on 20 rabbits that were then assigned to 2 groups. The control group received saline and the experimental group received atorvastatin intra-articularly once a week for 3 weeks. After sacrifice at 12 weeks, the cartilage tissue of the knee joint was evaluated macroscopically, histopathologically and at a cellular level by electron microscope. Lesions in the cartilage tissue of the medial compartment of the knee were categorised according to the Mankin system for histological and histochemical stages and the Pelletier system was used for macroscopic classification.

The mean total points obtained from the evaluation of the lesions which developed in the femoral medial condyle and tibial medial plateau cartilage tissue were 11.33 ± 0.667 and 1.5 ± 0.687 , 11.56 ± 0.709 and 1.40 ± 0.618 for the control group and the experimental group respectively, determining statistical significance between the two groups ($p < 0.05$). A statistically significant difference was determined between the groups for the macroscopic results ($p < 0.05$).

When the mid layer of cartilage tissue was evaluated by electron microscope at the cellular level in the experimental group, healthy cartilage tissue with appropriate chondrocyte and matrix structure was observed, no image of pericellular halo, a shadow complex and no impairment of the endoplasmic reticulum structure. In the control group, pyknotic nuclei were

observed and irregular collagen fibres, pericellular halo was determined around chondrocytes in the sections evaluated, saccular structures in the endoplasmic reticulum and no shadow complex.

In conclusion, a chondroprotective effect of statin on cartilage tissue was determined in this experimental osteoarthritis model evaluated macroscopically and by light and electron microscope. According to the results obtained from the electron microscope evaluation at the cellular level, it is believed that the chondroprotective effect of the statin is that, by protecting the structure of the endoplasmic reticulum and shadow structure, it ensures the continuation of the formation and expression of proteoglycans.

Key Words: Statin, Experimental osteoarthritis, Chondroprotective effect, Electron microscope

GİRİŞ

Osteoartrit, yakın zamana kadar yaşlanmanın kaçınılmaz bir sonucu olarak gelişen ve patogenetik mekanizmanın 'aşınma ve yıpranma' olduğu öne sürülen bir hastalık olarak kabul edilmekte iken, günümüzde çeşitli biyokimyasal ve mekanik etkenlerle tetiklenen yıkım ve onarımın birlikte olduğu metabolik olarak aktif, dinamik bir süreç olarak değerlendirilmektedir (1).

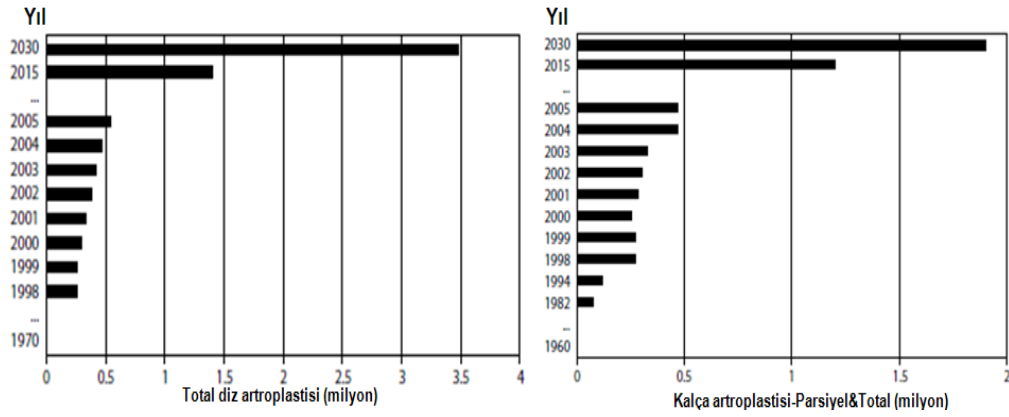
Eklem kıkırdağı, normal kıkırdak fonksiyonlarının devamından sorumlu olan ve ekstrasellüler matriks moleküllerinin metabolizmasını düzenleyen kondrosit hücrelerinin oluşturduğu özelleşmiş bir dokudur (1).

Kondrositler ve sinoviyositler metabolik açıdan oldukça aktif hücreler olup çeşitli hormon, sitokin, büyüme faktörü ve mekanik stres gibi faktörlere yanıt verirler. Fizyolojik şartlarda ekstrasellüler matriksin sentezi ve yıkımı denge içindedir. Sentez ve yıkım süreçleri arasındaki dengenin bozulması osteoartrit ve romatoid artrit gibi dejeneratif eklem hastalıklarına yol açar (1).

Dünya Sağlık Örgütü' nün tahminlerine göre 65 yaş üstü erişkinlerin kabaca %25' inde bu hastalığa bağlı ağrı ve fonksiyon bozukluğu vardır. OA hemen her yaş grubunu etkilemekle beraber, prevalansı erkeklerde 50, kadınlarda 40 yaşın üzerinde dramatik olarak artar (2).

Ülkemizde hastalık yükü çalışmalarında OA ön sıralarda (yedinci sırada ve toplam hastalık yükü içinde %2.9) yer almaktadır. 2005 yılında ülkemizden yayımlanan bir çalışmada, Antalya şehri popülasyonunda 50 yaş üstünde 655 kişide, semptomatik diz OA prevalansı %14.8 (kadınlarda %22.5 ve erkeklerde %8) olarak bildirilmiştir (2).

Amerika' da yapılan bir çalışmanın sonucunda 2030 yılında osteoartritli hasta sayısının 67 milyon kişiye ulaşacağı belirtilmiştir. Buna paralel olarak; kalça artroplastisi sayısının yılda 1.85 milyon, diz artroplastisi sayısının da 3.48 milyon olacağı tahmin edilmektedir (3), (Şekil-1).



Şekil-1: ABD’ de diz ve kalça protezleri insidansındaki artış (3).

Osteoartritin evresi ilerledikçe tedavi maliyeti de artmakta ve ileri evre OA’ lılar da yaklaşık olarak ikiye katlanmaktadır. 2009 yılında İspanya’ da yapılan bir çalışmada Kellgren/Lawrence evre 4 hastaların direk yıllık maliyeti evre 1’ den yaklaşık %45 daha yüksektir. Kalça artroplastisinin 2005’ den 2030’ a %174, diz artroplastisinin %673 artacağı tahmin edilmektedir (2).

Osteoartritin uygun tedavisi farmakolojik ve farmakolojik olmayan tedavi kombinasyonunu gerektirmektedir (4). Mevcut farmakolojik yöntemler, yaşlanan toplumda yaygın, ilerleyici ve hayat kalitesini olumsuz etkileyen OA’ nın ilerlemesini durdurmak yerine çoğunlukla semptomatik tedavi yönünde etki etmektedir. Artroplasti ve osteotomi gibi cerrahi yöntemlerin uygun hasta seçiminde ve iyi cerrahi teknikle yapılması durumunda sonuçları yüz güldürücüdür. Bununla birlikte cerrahi endikasyonu bulunmayan veya cerrahi tedavinin tartışmalı olduğu erken-orta evre primer OA vakalarında üzerinde çalışılması gereken OA progresyonunu yavaşlatabilen hatta geri çevirebilen kıkırdak koruyucu ajanların geliştirilmesi amacıyla günümüzde birçok araştırma yapılmaktadır. Bu çalışmalar kıkırdak ekstrasellüler matrisine (ESM) ve kondrositlere yönelik, kıkırdakta yapım ve yıkım arasındaki dengeyi sağlamaya yöneliktir (5).

Statinler, karaciğerde 3-hidroksi-3-metilglutaril coenzim A (HMG-CoA) enzimini inhibe ederek hiperkolesterolemi tedavisinde kolesterol sentezini azaltmaktadır, ayrıca kardiyovasküler morbidite ve mortaliteyi azalttığı birçok epidemiyolojik çalışmada gösterilmiştir. Bu etkilerinin yanısıra kolesterol düşüşünden bağımsız olarak endotel işlevlerine, trombosit

fonksiyonlarına, vasküler inflamasyona ve aterosklerotik plak yapısı üzerine de olumlu etkisi vardır. Tüm bu etkilere pleiotropik etki denilmektedir. Statinlerin bu etkileri son yıllarda pek çok klinik ve prelinik araştırmaya konu olmuştur.

Lazzerini ve ark.'nın (6) yaptığı çalışmada IL-1 ile uyarılmış insan kondrosit hücrelerinde statinin MMP-3 salınımını azalttığı gösterilmiştir. Akasaki ve ark. (7) yaptığı deneysel hayvan osteoartrit modelinde ise intraartiküler statin verilmesiyle kıkırdakta morfolojik ve histolojik artritlik değişikliklerde azalma tespit etmişlerdir. Dombrecht ve ark.'nın (4) yaptığı diğer bir çalışmada statin uygulanan insan kıkırdak hücresinde IL-6 ve IL-8 düzeylerinde azalma tespit etmişler ve kıkırdak koruyucu özelliğini düşünmüşlerdir.

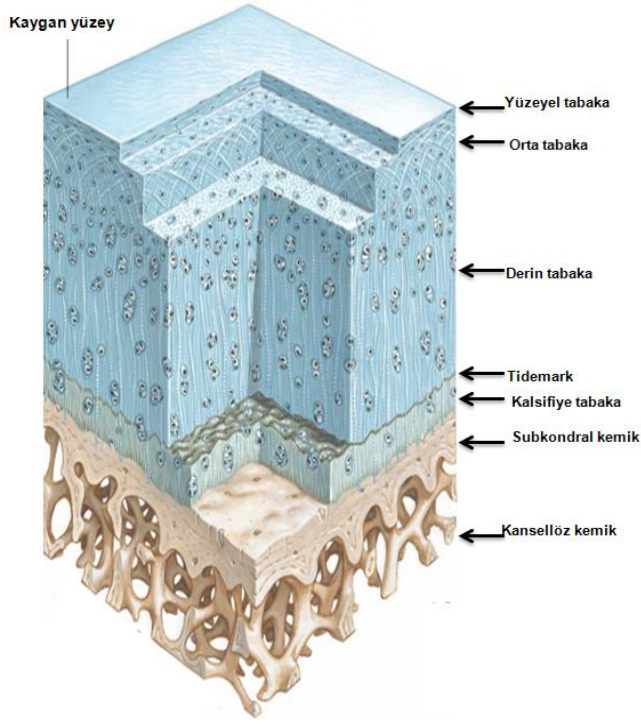
Yaptığımız literatür incelemelerinde statinlerin kondroprotektif etkilerinin ışık mikroskobu ile yapılan çalışmalar ile araştırıldığı görülmüştür. Ancak elektron mikroskobu ile yapılan kıkırdak koruyucu etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlamadık. Bu amaçla tavşanda deneysel diz osteoartrit modeli oluşturup statinlerin kıkırdak koruyucu etkilerini ışık ve elektron mikroskopları ile inceleyip hücre içindeki ve dışındaki değişiklikleri değerlendirdik.

Eklemler Kıkırdağı

Eklemler kıkırdağı, eklem yüzeylerinde sürtünmeyi azaltan ve yüklenme kuvvetlerinin dengeli geçişlerini sağlayan özelleşmiş bir bağ dokusudur. Damar ve sinir yapılarına sahip olmayan eklem kıkırdağı oldukça aktif ve karmaşık bir yapıya sahiptir (8).

Eklemler Kıkırdak Tabakaları:

Eklemler kıkırdağı dört tabakadan oluşur (8-11), (Şekil-2).



Şekil-2: Kıkırdak dokusu tabakaları (12) .

Yüzeyel Tabaka

Hacim olarak en küçük kıkırdak tabakası olup proteoglikanlar, kollajen fibriller ve kondrositlerden oluşmaktadır. Bu tabakanın şok absorbe edici özelliğinin maksimum düzeyde oluşabilmesi için proteoglikan oranı en düşük su oranı ise en yüksektir. Ayrıca kollajen lifler oluşacak makaslama kuvetlerine daha iyi mukavemet gösterebilmek için yüzeye paralel olarak dizilmiştir. Kondrositler ise yassılaştırmış ve yüzeye paralel olarak dizilmiş olup büyük bir kısmı metabolik olarak inaktiftir (9, 13-18) .

Orta Tabaka

Kollajen lifleri daha düzensiz bir şekilde yerleşmiştir. Bu tabakadaki kollajen fibriller, primer olarak kompresif yüklere karşı gelir. Kondrositler ise daha yuvarlak yapıdadır. Metabolik olarak daha aktif hücre yapısı ile uyumlu olan daha büyük endoplazmik retikulum, golgi cismi ve mitokondrilere sahiptir (9, 13-17).

Derin Tabaka

Proteoglikan yoğunluğu en yüksek, su yoğunluğu en az olan bölgedir. Bu bölgedeki kollajen lifler, eklem yüzeyine dik şekilde yerleşmiş olup kompresif yüklere direnç sağlar. Kondrositler ise yuvarlak yapıda, yüzeye dik şekilde kolonlar oluşturacak şekilde yerleşmiştir (9, 13-17).

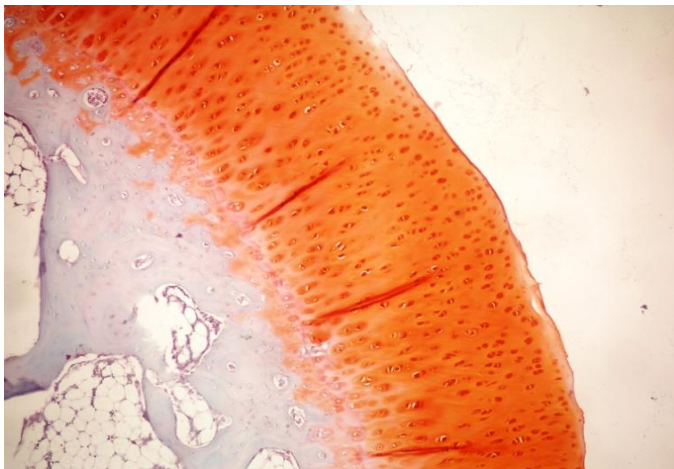
Kalsifiye Tabaka

Kıkırdağın kemiğe bağlantısını sağlayan özellikler taşır. Hiyalin kıkırdağı subkondral kemikten tidemark denilen bir kısım ile ayırır. Bu bölge subkondral kemikten besleyici damarların geçişini engeller (9, 13-17).

Ekstrasellüler Matriks - Kondrosit

Ekstrasellüler matriks; içeriği, kollajen fibril çapı ve dizilimi açısından farklı özellikler gösteren perisellüler, teritoryal ve interteritoryal alanlara ayrılmıştır. Perisellüler matriks, kondrositi tamamen çevreleyen ince bir tabakadır. İçerisinde kollajen yapı bulunmamaktadır; proteoglikan konsantrasyonu ise yükündür. Teritoryal matriks, perisellüler matriksi çevreler ve yoğun bir fibriler ağ oluşturur. Interteritoryal matriks ise, kollajen fibriller açısından teritoryal matrikse göre daha zengin bir alandır (19-20).

Eklem kıkırdağı, ekstrasellüler matriks içine yerleşmiş olan kondrositlerden oluşur (Şekil-3).



Şekil-3: Ekstrasellüler matriks içindeki kondrositler.

Kondrositler eklem kıkırdağının oluşumu ve sürekliliğinden sorumludur. Metabolik olarak aktif olan bu hücreler; büyüme faktörleri, interlökinler, farmakolojik ajanlar, matriks molekülleri, mekanik yüklenmeler ve hidrostatik basınç değişiklikleri gibi uyarılarla anabolik ve katabolik süreçte rol alırlar. Matriksin devamlılığının sağlanması, bu yapım ve yıkım sürecinin dengede olmasına bağlıdır (9).

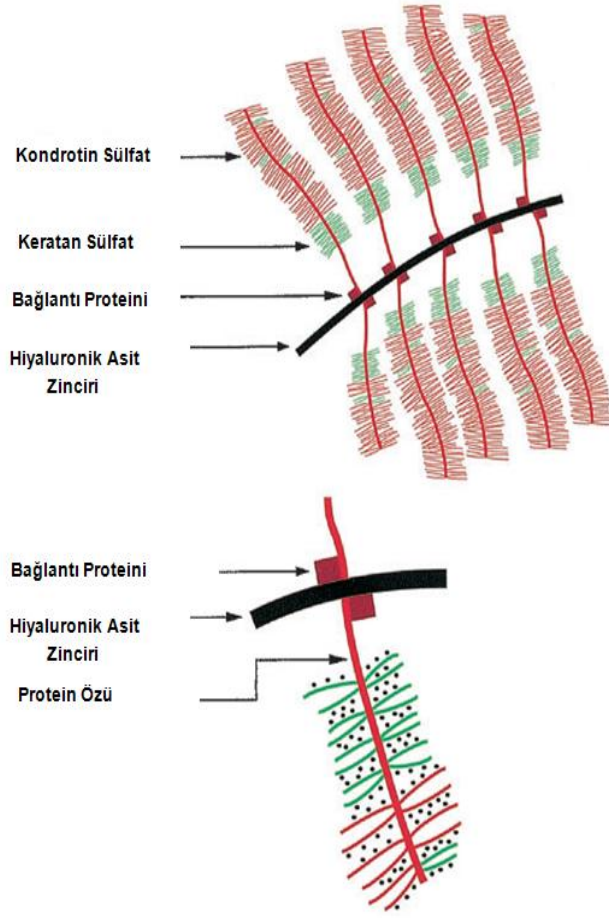
Ekstraselüler matriksin bileşenleri, %65-80 oranında suyla beraber proteoglikanlar, kollajenler ve daha düşük oranlarda bulunan diğer protein ve glikoproteinlerdir (9).

Kollajenler, eklem kıkırdağını oluşturan en önemli yapısal bileşenlerdir. Kıkırdağın kuru ağırlığının yaklaşık %70' ini oluştururlar. Matriks esas olarak tip II kollajenden oluşur ayrıca tip V, VI, IX, X, XI, XII ve XIV kollajenler de düşük miktarlarda bulunur. Toplam kollajenin %90-95' i tip II' dir (9). Tüm kollajen lifleri birbirine çapraz kovalen bağlarla bağlı üç adet polipeptid zincirinden oluşan; üçlü heliks yapısındadırlar (11).

Elektron mikroskobu görüntülerinde birbirlerini çaprazlayan liflerin daha çok tip 2, 9, 11 kollajen lifleri olduğu belirlenmiştir (11).

Kollajenlerin eklem kıkırdağındaki en önemli fonksiyonları dokuya tensil özellikler kazandırmak ve proteoglikanları ekstraselüler matriks içinde immobilize etmektir (21).

Proteoglikanlar, bir protein özü ve glikozaminglikan zincirlerinden meydana gelen kompleks makromoleküllerdir (22). Kıkırdağ proteoglikanlarının %80-90' ı agregan olarak bilinen, bir bağlayıcı protein (link protein) aracılığı ile hiyaluronik aside bağlanarak agregatlar oluşturmuş yapılardır (21), (Şekil-4).



Şekil-4: Agregan molekülünün şematik organizasyonu (23).

Eklem kıkırdağında bulunan GAG' lar: Keratan sülfat, dermatan sülfat, kondrotin sülfat ve hiyaluronik asittir. Proteoglikanlar kıkırdak dokusunda farklı konsantrasyonlarda bulunmakta olup travma ve yaş ile bu oranları değişmektedir. Proteoglikanların ekstrasellüler matrikse sağlamlık kazandırma, hücrelerin çoğalması, migrasyonu, farklılaşması gibi önemli rolleri vardır (24, 25). Metakromazi normal kıkırdağın en önemli özelliklerinden biri olup glikozaminoglikanların bir göstergesidir. Kıkırdak dokusundaki metakromazi kaybı diğer değişiklikler olmadan osteoartrit birincil göstergesidir (26).

Matriks metalloproteinazlar (MMPs)

Ekstrasellüler matriks (ESM) ile bazal membran komponentlerini parçalama özelliğine sahip olan ve aktif bölgesinde çinko içeren bir enzim grubudur (27).

Bu enzimler, fibroblastlar, osteoblastlar, kondrositler, endotel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller gibi çeşitli bağ dokusu hücrelerinden proenzim halinde salgılanarak dokunun normal gelişimsel süreci, yara iyileşmesi ve yeniden yapılanması gibi birçok fizyolojik durumda önemli bir rol alırlar (28).

MMPs substrat spesifitesine göre 4 ana grupta sınıflandırılır (29, 30).

- Kollajenazlar: MMP1, MMP8, MMP13
- Jelatinazlar: MMP2, MMP9
- Stromelysinler: MMP3, MMP10, MMP11
- Membran tip metalloproteinaz 1-5

Eklem kıkırdağındaki matriks metalloproteinazlar; stromelisin, kollajenaz, jelatinaz ve katepsinlerdir. Kollajenaz, Tip II ve Tip X kollajen üçlü sarmal yapısını yıkan bir enzim olarak tanımlanmıştır. Jelatinaz da kollajenaz tarafından yıkılmış olan sarmal yapıların açığa çıkardığı zincirleri bozan bir enzimdir. Stromelisin ise Tip II ve Tip IX' nın sarmal olmayan yapılarına ve agreganın yapısındaki kor proteinine karşı etkili olmaktadır (31, 32).

Hücre kültürü ve deneysel OA hayvan modelleri ve OA gelişen insanlardan alınan subkondral kemik, kıkırdak ve sinovyal membran doku örneklerinde özellikle MMP 1- 3- 9- 13 düzeylerinde kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur (33, 34, 35). Bu enzimlerin dokulardaki etkileri çeşitli faktörlerce aktive ya da inhibe olmaları ile sağlanmaktadır (28).

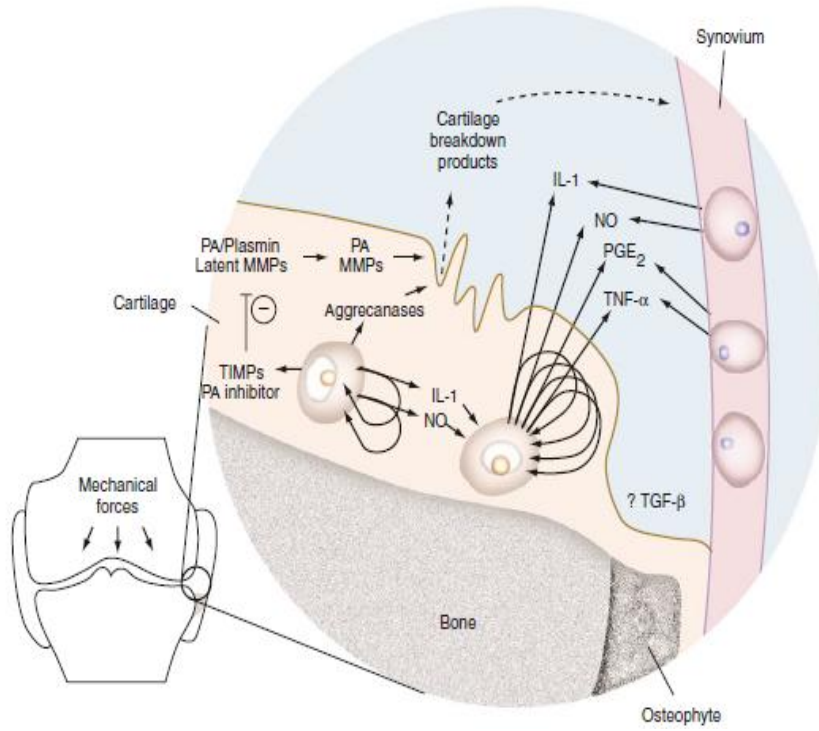
Osteoartrit Patofizyolojisi

Osteoartrit eklemlerin yaygın bir hastalığıdır. Eklem kıkırdağının yük taşıyan bölgelerinde hasarlanma sonucu subkondral kemikteki değişiklikler, eklem kapsülünde kalınlaşma, sinovit hali ve değişik derecelerde osteofit oluşumu ile karakterize bir patolojidir (36).

Normal eklem kıkırdağının travmaya yanıtı suboptimaldir. Kıkırdağın avasküler yapıda olması ve indiferansiye hücre yetersizliği nedeniyle, sadece kıkırdağı ilgilendiren yaralanmalar, kanama ve fibrin pıhtı oluşumunu sağlayamadığından iyi bir iyileşme potansiyeline sahip değildir. Bu yüzden kondrositler sadece sınırlı oranda proliferasyon olarak yaralanma bölgesinde matriks makromoleküllerinin sentezini artırır, fakat yeni matriks ve hücreler, yüzeyi restore edemezler (16). Travmatize doku tidemark tabakasını geçmediği müddetçe onarım yükü sadece kondrositlere düşer. Bu sürece intrensek onarım dönemi denir. Tidemark tabakasını geçerse mezenkimal hücreler, fibrin tıkaç devreye girer ve fibröz kıkırdak ile sonuçlanan ekstrensek onarım dönemi oluşur (37).

Osteoartrit dejeneratif bir hastalık olup çeşitli biyokimyasal ve mekanik etkenlerle tetiklenen yıkım ve onarımın bir arada olduğu metabolik olarak aktif, dinamik bir süreç olarak değerlendirilmektedir (38). OA'nın erken döneminde kondrositlerde geçici bir proliferatif yanıt, ESM sentezinde, sitokin ve proteinaz enzim aktivitelerinde artış gözlenir. Osteoartrit üzerine yapılan çalışmalarda elde edilen belki de en ilginç sonuçlardan biri osteoartritli dokulardan elde edilen kondrositlerin normal dokulardan elde edilen kondrositlere göre metabolik olarak daha aktif olmasıdır (28).

Kondrositler bazı mekanik ve kimyasal streslere yanıt olarak sahip oldukları mekanik reseptörler ile IL-1beta, TNF- α ve nitrik oksit (NO) gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını ve üretimini sağlarlar. NO ise matriks makromoleküllerinin degradasyonuna yolaçan IL-1' in salınımını tekrar uyarır (4, 37), (Şekil-5).



Şekil-5: Osteoartrit patogenetik mekanizmaları şeması (37).

Son yıllarda yapılan birçok çalışma IL-1' in proteoglikan sentez inhibisyonu üzerindeki etkisini NO aracılığıyla yaptığını desteklemektedir (39, 40).

NO, kollajen sentezinin azaltılması, MMP aktivasyonunun artırılması, yüzeysel kırık dokusundaki kondrositlerin apoptozisinin uyarılmasında etkilidir. Sağlıklı kırıkdağa göre osteoartritli kondrositte apoptozis görülme insidansı daha fazladır (41).

NO, inflamatuvar olaylarda indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) enzimi tarafından sentezlenir. Reaktif oksijen radikallerinin varlığında ise önce peroksinitrite (ONOO-) sonra da hidroksil radikallerine (OH ve H₂O₂) dönüşür. Oluşan peroksinitrit ve reaktif oksijen radikalleri kırıkdağ dejenerasyonuna yol açan oksidatif hasarı başlatır ve hücre dışı matriks yıkımına neden olur (42).

IL-1 ve TNF- α ayrıca kollajen sentezini azaltır ve diğer inflamatuvar mediatörlerden; IL-6, NO, PGE-2 salınımını artırır (41).

IL-1, TNF-α, IL-6 ve NO gibi katabolik sinyal oluşturan mediatörler kırıkdağ matriks yıkımına neden olan kollajenaz (MMP-1, -8, -13), jelatinaz

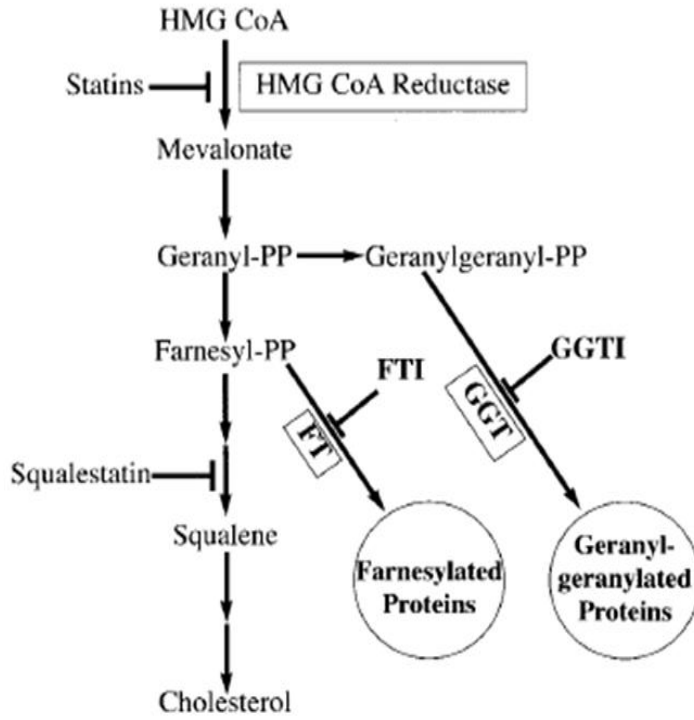
(MMP-2 -9), agreganaz, elastaz ve fibrin yıkıcı stromelisin-1 (MMP-3),’ in oluşturduğu matriks metalloproteinazları (MMP) aktive ettiği gösterilmiştir (43, 44).

Osteoartrit etiopatogenezindeki ilk olarak gelişen en önemli biyokimyasal değişiklik proteoglikan sentezinde artış olmasına rağmen proteoglikan miktarının azalmasıdır. Bu da proteolitik enzimlerin aktivitesinin daha yüksek olmasından dolayıdır (45).

Anabolik ve katabolik sinyaller arasındaki denge kırıldık homeostazını korur. Osteoartritli kırıldıkta katabolizma daha baskın hale gelir (36). Kollajen ve fibriller arasındaki düzenli ve sıkı bağlantılı yapı bozulmaya başlar. Matriksin su içeriği belirgin olarak artar. Tüm bunların sonucunda matriksin sertliği azalır. Kırıldık dokusunun kompresyon ve mekanik strese daha dirençsiz hale gelmesine ve progresif kırıldık kaybına yol açar. Kırıldık yüzeyi düzensizleşir ve yüzeysel yarıklar belirir. Proteoglikan dağılımı değişir. Geç dönemde morfolojik olarak eklem yüzeyinin büyük bir bölümü düzensizleşir, fibrilasyon giderek derinleşir ve subkondral kemiğe kadar ulaşır (37).

Statinler (3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzimA redüktaz inhibitörleri)

Statin olarak adlandırılan, 3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri, hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan ve rölatif olarak plazma kolesterol seviyelerinde azalmalara neden olan bir ilaç grubudur (46, 47) .



Şekil-6: Statin duyarlı biyosentez yolu (46).

HMG-CoA=Hidroksimetilgluteral-koenzim A, PP=Pirofosfat

FTI=Farnesil Transferaz inhibitör, GGTI=Geranylgeranyl Transferaz inhibitör

HMG-CoA redüktaz inhibitörlerinin yararlı etkileri genel olarak kolesterol sentezini azaltabilme özellikleridir. Fakat reaksiyon ürünü olan mevalonat sadece kolesterolün öncüsü değil, aynı zamanda pek çok nonsteroid isoprenoid bileşmelerinin de öncüsüdür (Şekil-6). Bu isoprenoidler hücre çoğalması, hücre sinyal iletimi, hücre farklılaşması, apoptozis, membran transportu ve miyelinizasyon gibi hücre fonksiyonları için gereklidir (46). Mevalonat yolunun inhibisyonu farklı pleiotropik etkilerle sonuçlanır (48). Statinlerin kardiyovasküler morbidite ve mortaliteyi azaltıcı etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir. Genellikle bu etkiler lipid düşürücü etkiye bağlansa da, yapılmış olan bu çalışmaların alt gruplarında lipid düşürücü etkilerinden bağımsız olan direkt kardiyoprotektif etkileri olduğu da düşünülmektedir. Statinlerin bu etkilerine ise genel olarak pleiotropik etki denilmektedir (4, 49-51). Statinlerin antiinflamatuar ve immunomodülatör özellikleri ilk kez koroner arter hastalıklarında arter duvarındaki inflamasyonu inhibe etmeleri ve aterosklerotik plağı stabilize etmeleri ile ortaya konulmuş,

bu etkilerini de nötrofil kemotaksisi ve transendotelyal migrasyonu engelleyerek gösterdiği bildirilmiştir (52-55).

Statinlerin matriksmetallopeptidaz enziminin makrofajlardan salınımını azalttığı da yayınlarda gösterilmiştir (47, 56-58). Ayrıca OA patogenezi üzerindeki etkileri temel olarak inflamatuvar hücre kemotaksisini ve proteazların salınımını önleyerek olduğu çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir.

Barsante ve ark. (55) oral atorvastatin uyguladıkları fare deneysel osteoartrit modelinde yüksek olan IL-1, TNF- α , IL-6 düzeylerinin azaldığını ELİSA yöntemiyle tespit etmişlerdir.

Yudoh ve ark. (47) oral simvastatin uyguladıkları fare diz osteoartrit modelinde IL-1 β inhibisyonu ile MMP-1,-13salınımını azalttığını bildirmişlerdir.

Leung ve ark. (59) fare deneysel osteoartrit modelinde intraperitoneal verilen simvastatinin kıkırdak dejenerasyonunu ve serum IL-6 düzeyini azalttığını göstermişlerdir.

Simopoulou ve ark. (60) atorvastatin uyguladıkları insan osteoartritik kıkırdak hücre kültüründe MMP-13 mRNA düzeyinde azalma, tip2 kollajen ve agregan mRNA düzeylerinde ise artış tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada statinlerin kıkırdak koruyucu etkilerini ışık ve elektron mikroskopları ile inceleyip hücre içindeki ve dışındaki değişiklikleri değerlendirmeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

“ Erken Dönem Deneysel OA Modelinde İntraartiküler Uygulanan Statinin Kondroprotektif Etkilerinin Elektron Mikroskop Altında Araştırılması” isimli çalışmamız Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırmaları Etik Kurulunun 15.02.2011 tarihli toplantısında görüşüldü. 2011-02110 etik kurul kararı ile Deney Hayvanları Yetiştirme, Araştırma Merkezi'nden temin edilen ağırlıkları 2500-4000 gr arasında olan 20 adet erişkin Yeni Zelanda tavşanını kullandık.

Deneysel diz OA oluşturmak için Yoshioka ve ark.'nın (60) tanımladığı gibi tavşanların ön çapraz bağları (ÖÇB) kesilerek oluşturulan modelini uyguladık.

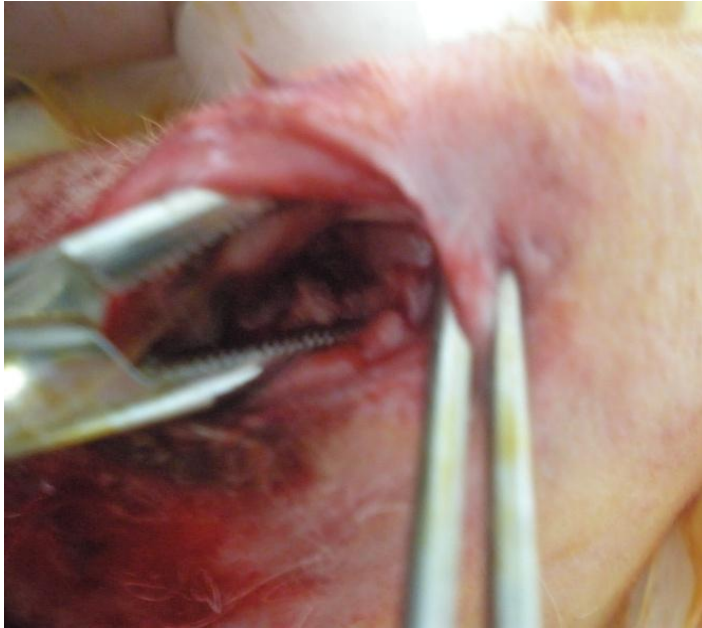
20 adet tavşanı intraartiküler enjeksiyon yapılması için rastgele, her grupta 10 tavşan olmak üzere 2 gruba ayırıp, kontrol grubuna 0,5 ml serum fizyolojik intraartiküler olarak yapılırken, deney grubuna 100 ml serum fizyolojik içerisine 40 mg atorvastatin eklenerek elde edilen karışımdan (Ator®; Pfizer, USA) 0,4 mg/ml/kg olarak yaptık.

Cerrahi Teknik

Enfeksiyon profilaksisi için cerrahi girişimden 30 dakika önce 50 mg/kg sefazolin sodyum (Sefazol®; Mustafa Nevzat İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye) kas içine uygulandı. Anestezi amacıyla % 2'lik ksilazin hidroklorür (Rompun®; Bayer Healthcare, Leverkusen, Germany) 8 mg/kg ve ketamin hidroklorür (Ketalar®; Pfizer, USA) 100 mg/kg dozunda kas içine uygulandı. Sağ arka ekstremiteleri tıraş edilen tavşanların ameliyat sahası %10 povidin iyod (Batticon®; Adeka, Samsun, Türkiye) solüsyonu kullanılarak temizlendi ve steril olarak örtüldü. Ön-orta hattan yapılan longitudinal cilt insizyonu sonrası medial parapatellar artrotomi ile patella laterale disloke edilerek yeterli açılım sağlandı. Diz tam fleksiyonda iken ön çapraz bağ (ÖÇB) kesildi. (Şekil7), (Şekil8).



Şekil-7: Sağ diz eklemi preoperatif hazırlık.



Şekil-8: Medial parapatellar artrotomi ve ön çapraz bağı kesilmesi.

Ön çapraz bağı tam kat kesildiği ön çekmece testi ile doğrulandı

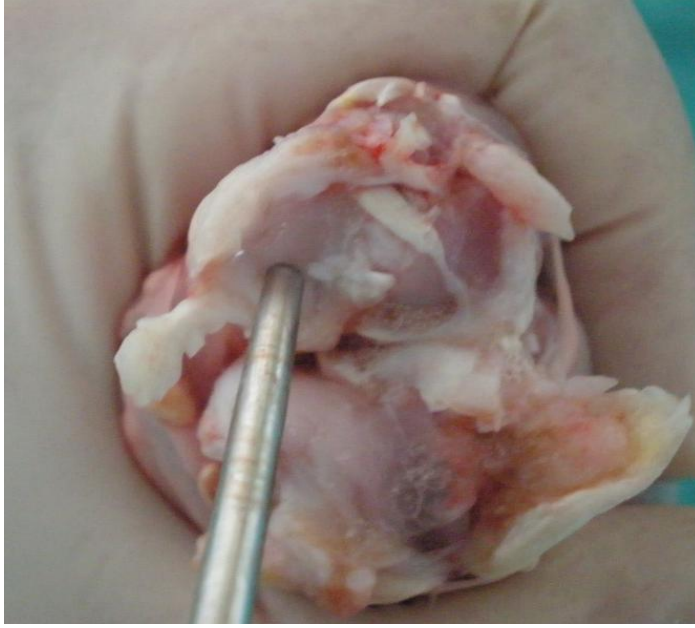
Eklem boşluğu steril serum fizyolojik ile yıkandı ve eklem kapsülü 3/0 emilebilen iplik ile (Safil-Aesculap AG and CO.KG-Braun), cilt ise 3/0 emilmeyen iplik ile (Ethilon- Ethicon- Johnson and Johnson) kapatıldı.Cerrahi

sonrası analjezi amacıyla içme sularına 1-2 mg/kg/100 ml parasetamol konulan tavşanlar standart yem ile beslenerek kafes aktivitesine bırakıldı.

İntraartiküler ilaç enjeksiyonu uygulaması için 30 mg/kg ketamin hidroklorür ile sedasyon sağlanan tavşanlar randomize olarak her grupta 10 tavşan olacak şekilde iki gruba ayrıldı ve yapılan cerrahi sonrası birinci haftadan itibaren birer hafta ara ile toplam üç kez kontrol grubuna 0,5 ml hacminde serum fizyolojik, deney grubuna 100 ml serum fizyolojik içerisine 40 mg atorvastatin eklenerek elde edilen karışımdan 0,4 mg/ml/kg olacak şekilde eklem içine uygulandı. Deney hayvanları son enjeksiyondan 12 hafta sonra dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Deneysel OA modeli geliştirmek için ÖÇB' i kesilen diz eklemleri ışık mikroskopisi için sinovya, femur ve tibia eklem yüzeylerini içerecek şekilde çıkartıldı (Şekil-9). Eş zamanlı olarak 16 gauge kemik iliği biyopsi iğnesiyle medial eklem kıkırdaklarının dejeneratif bölgelerinden elektron mikroskopisi için doku örnekleri alındı (Şekil-10).



Şekil-9: Işık mikroskop için dokunun hazırlanması.



Şekil-10: Elektron mikroskop için kemik biyopsi iğnesiyle örnek alınması.

Histopatolojik Değerlendirme

Diz eklemlerinin medial kompartmanı (medial femoral kondil ve tibia medial platosu) Pelletier ve ark. tarafından tanımlanan morfolojik evreleme sistemi kullanılarak, kıkırdak dokusundaki erozyon derinliği ve dejeneratif değişiklikler; minimal fibrilasyon, yüzeysel ve orta tabakada erozyon, derin tabakada erozyon ve subkondral kemikte erozyon varlığına göre değerlendirilmiştir (61), (Tablo-1).

Tablo-1: Pelletier evreleme sistemine göre kıkırdak doku lezyonlarının makroskopik evrelemesi (61).

Evre 0	Sağlam yüzey
Evre 1	Minimal fibrilasyon veya yüzeysel sarımtırak renk değişikliği
Evre 2	Yüzeysel veya orta tabakada erozyon
Evre 3	Derin tabakada erozyon
Evre 4	Subkondral kemikte erozyon

Kıkırdak dokudaki histolojik ve histokimyasal değişikliklerin değerlendirilmesi için Mankin ve ark' nın (62) tanımladığı eklem kıkırdak doku tabakalarındaki histolojik yapısal ve hücresel değişiklikler, safranin-O tutulumu, tidemark yapısının bütünlüğü değerlendirilmiştir (Tablo-2). Mankin histopatolojik evrelemesine göre normal eklem kıkırdağı için beklenen puan aralığı 0-1 kabul edilmiş olup; hafif, orta, şiddetli osteoaritik değişiklikler için beklenen puan aralıkları ise sırasıyla 2-5, 6-9, 10-14 olarak belirtilmiştir (63, 64).

Tablo-2: Mankin Sınıflaması (62).

Bölüm	Alt Bölüm	Puan
Yapı	Normal	0
	Yüzeysel düzensizlikler	1
	Yüzeysel düzensizlikler ve pannus	2
	Orta tabakaya doğru yanklar	3
	Derin tabakaya doğru yanklar	4
	Kalsifiye tabakaya doğru yanklar	5
	Tamamen dezorganizasyon	6
Hücreler	Normal	0
	Yaygın hiperselülarite	1
	Klonlaşma	2
	Hiposelülarite	3
Safranin-O ile boyama	Normal	0
	Hafif derecede düşük	1
	Orta derecede düşük	2
	İleri derecede düşük	3
	Boyama yok	4
Tidemark bütünlüğü	Sağlam	0
	Damarlar tarafından geçilmiş	1
Toplam		14

0-1: Normal 2-5 : Hafif 6-9: Orta 10-14:Şiddetli

Elde edilen veriler SPSS for Windows 13.0 ortamında bilgisayara kayıt edilip, makroskopik ve mikroskopik değerlendirmeye ilişkin değişkenler ortalama ve standart hata ile birlikte verilmiştir. Sonuçlara göre değerler arası

karşılaştırmada Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Çalışmada $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

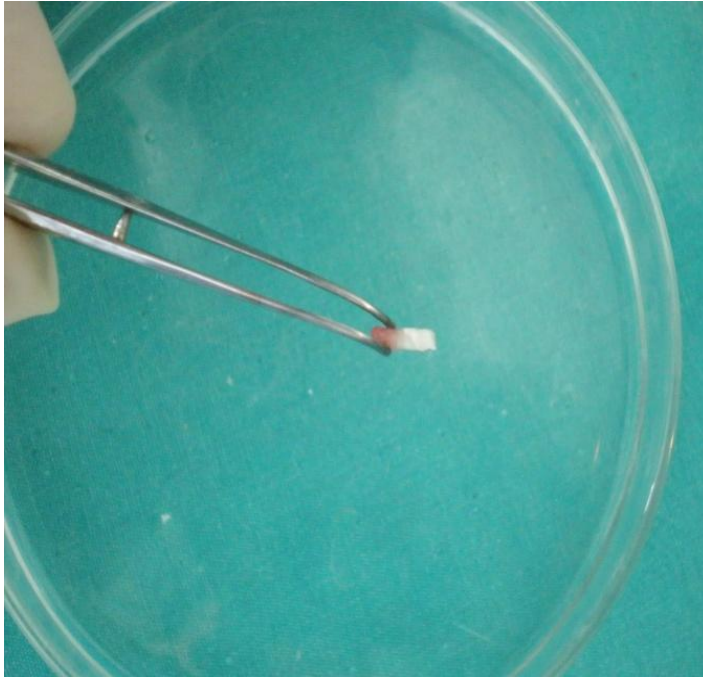
Doku Hazırlanması

Deney hayvanlarının cerrahi girişim uygulanan diz eklemleri femur ve tibiaya ait eklem yüzeylerini içerecek şekilde eklem mesafesinden 2 cm uzaklıktan kesilerek çıkartıldı. Medial parapatellar artrotomi ile eklem aralığına ulaşıldı. Çevre yumuşak dokuların uzaklaştırılmasını takiben histopatolojik inceleme için diz eklemi medial kompartmanları %10'luk formaldehit solüsyonunda 5 gün süreyle tutularak dokuların fiksasyonu sağlandı. Takiben %10'luk formik asit solüsyonu içinde kemik dokusu dekalsifiye olana kadar bekletildi. Örnekler dehidratasyonu takiben parafin bloklara gömüldü. Rutin takip işlemler sonrası 5 mikron kalınlığında sagittal kesitler alınarak histopatolojik değerlendirme için hematoksilin-eosin ve safranin-O ile boyandı.

Eş zamanlı olarak eklem kıkırdağının aynı bölgelerinden elektron mikroskopisi için 16 gauge biyopsi iğnesiyle doku örnekleri alındı. Bu örnekler %5'lik glutaraldehit (0.13 M, pH: 7.2 fosfat tamponu içinde) ile +4 C° de 4 saat fikse edildi. Tampon solüsyonunda 2 kez 1 saat süreyle yıkanan dokular EDTA ile dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyonun tamamlandığı amonyum oksalat testi ile doğrulanan dokular tekrar tampon ile yıkandı ve %1' lik osmiyum tetroksit ile ikincil fiksasyon (+4 C° de 1 saat) gerçekleştirildi. Fosfat tamponu ile yıkanan dokular dereceli alkol serisinden geçirilerek (sırasıyla % 70, %90, %95, %100) dehidre edildi. Propilen oksit uygulaması sonrası Epon içine gömüldü. Polimerizasyon için 48 saat 60 C°'lik etüvde tutuldu. Elde edilen bloklardan Reichert Supernova ultramikrotom ile alınan yarı ince (1 µm) kesitler toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskopunda eklem kıkırdağı görüldü. Bu bölge küçültüldükten sonra 70 Å kalınlıkta ince kesitler bakır gridler üzerine alındı. Uranil asetat ve Reynolds' un kurşun sitrat solüsyonu ile kontrastlama yapıldı. Örnekler JEOL 100SX geçirimli elektron mikroskopunda incelenerek fotoğraflandı.



Şekil-11: Elektron mikroskop için örnek alınan bölge.



Şekil-12: Elektron mikroskop için dokunun hazırlanması.

BULGULAR

Çalışmamızda kontrol grubundan bir tavşan septik artrit sebebiyle öldüğü için kontrol grubu: 9, deney grubu: 10 adet tavşandan oluşmaktadır.

Makroskopik Bulgular

Diz eklemi medial kompartman kıkırdak dokuları, Pelletier evreleme sistemi makroskopik evrelemesine göre değerlendirildi. Statin uygulanan deney grubundaki tavşanların 4' ünde evre 0 (%40), 4' ünde evre 1 (%40), 2' sinde evre 2 (%20) tespit edildi. Kontrol grubundaki tavşanların 2' sinde evre 3 (%33), 7' sinde evre 4 (%77) tespit edildi (Tablo-4),(Şekil-13,14). Bu sonuçların gruplar arası istatistiksel değerlendirilmesinde; statin grubu ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Tablo-4: Pelletier evreleme sistemine göre eklem kıkırdak lezyonlarının gruplara dağılımı.

	Deney Grubu	Kontrol Grubu
Evre 0-2 (n)	10	-
Evre 3-4 (n)	-	9
Toplam (n)	10	9



Şekil-13: Deney grubu makroskopik incelemesi (Evre 0).



Şekil-14: Kontrol grubu makroskopik incelemesi (Evre 4).

Işık Mikroskopik Bulgular

Tavşanların sağ dizlerinin medial eklem yüzeyleri; Mankin histopatolojik evreleme sistemine göre: Kıkırdak yapısı, hücresel değerlendirme , matriksin safranin-O ile boyanma miktarı ve tidemark yapısı göz önüne alınarak mikroskopik olarak incelendi.

Tibia Medial Plato Kıkırdak Dokusu

Kıkırdak yapısının değerlendirilmesinde; deney grubundaki tavşanların 4' ünde (%40) normal (Şekil-15), 4' ünde (%40) yüzeyel düzensizlik, 2' sinde (%20) ise orta tabakaya doğru yarıklar tespit edildi. Kontrol grubundaki tavşanların 3' ünde (%33) tamamen dezorganizasyon (Şekil-16), 4' ünde (%44) kalsifiye tabakaya doğru yarıklar, 2' sinde (%22) ise derin tabakaya doğru yarıklar gözlemlendi.

Hücresel değerlendirilmesinde; deney grubundaki tavşanların 8' inde (%80) normal hücre, 2' sinde (%20) yaygın hipersellülerite tespit edildi. Kontrol grubundaki tavşanların 5' inde (%60) hiposellülerite, 4' ünde (%40) klonlaşma gözlemlendi.

Safranin-O ile boyanmanın değerlendirilmesinde; deney grubundaki tavşanların 8' inde (%80) normal, 2' sinde (%20) hafif derecede düşük boyanma tespit edildi. Kontrol grubundaki tavşanların 3' ünde (%30) boyanma görülmedi, 6' sında (%70) ileri derecede düşük boyanma görüldü.

Tidemark bütünlüğünün değerlendirilmesinde; deney grubundaki tavşanların 10' unda (%100) bütünlük sağlam tespit edildi. Kontrol grubundaki tavşanların 5' inde (%60) damarlar tarafından geçilmiş, 4' ünde (%40) sağlam olduğu gözlemlendi.

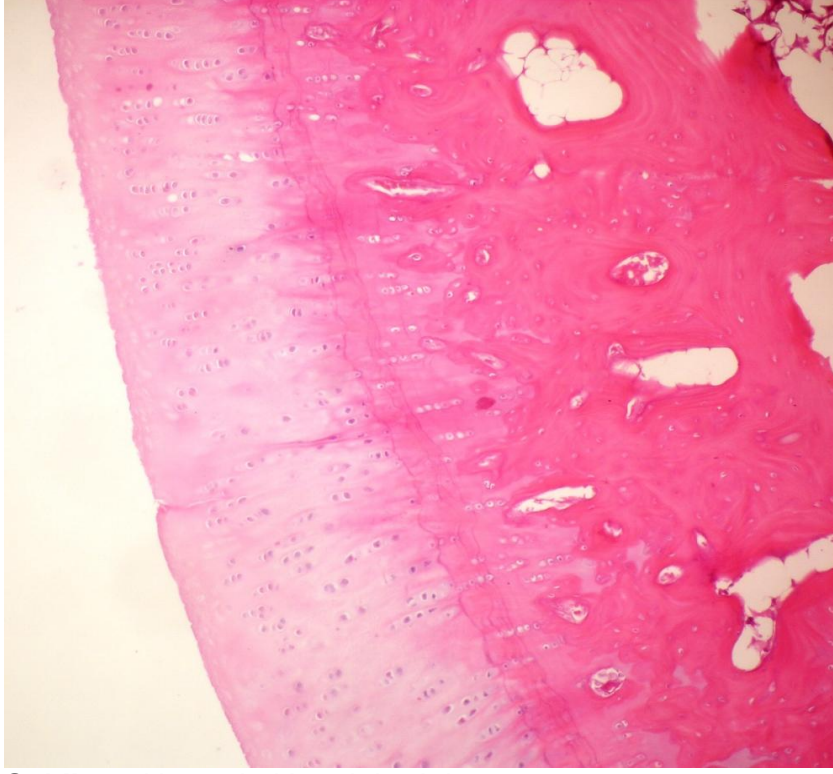
Deney ve kontrol grubundaki tüm tavşanların tibia eklem kıkırdaklarının almış olduğu histolojik skorlar tablo-5' de ayrıntılı şekilde verilmiştir. Grupların toplam Mankin skorları ve bu skorların ortalamaları ise tablo-6' da verilmiştir.

Tablo-5: Tüm tavşanların tibia eklem kıkırdaklarının almış olduğu ayrıntılı histolojik skorlar.

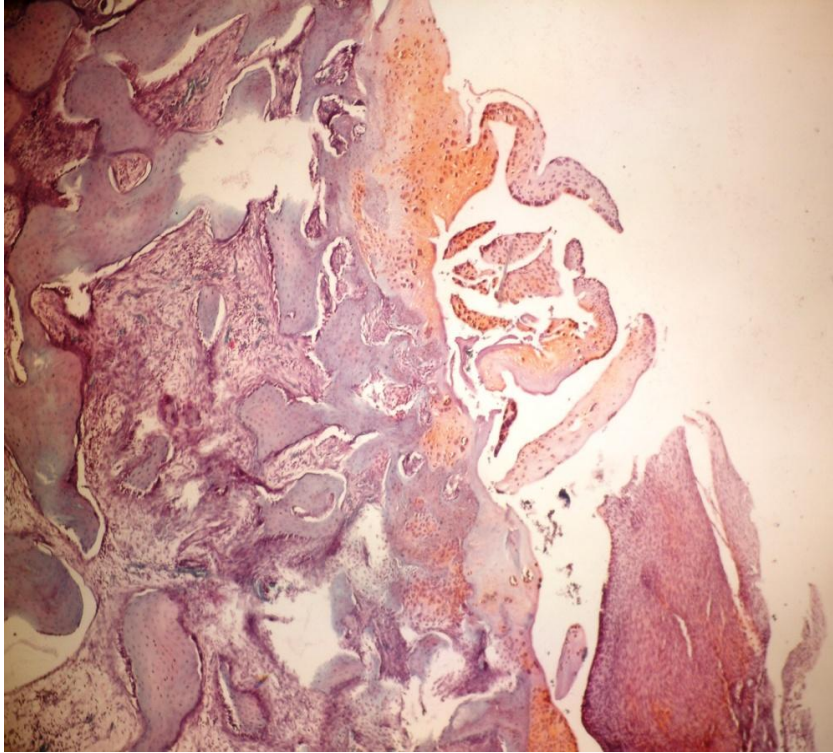
Tavşan tibia	Yapı	Hücreler	Safranin-O	Tidemark
Kontrol tibia 1	6	3	4	1
Kontrol tibia 2	6	3	4	1
Kontrol tibia 3	5	2	3	0
Kontrol tibia 4	5	3	3	1
Kontrol tibia 5	6	3	4	1
Kontrol tibia 6	5	3	3	1
Kontrol tibia 7	4	2	3	0
Kontrol tibia 8	5	2	3	0
Kontrol tibia 9	4	2	3	0
Deney tibia 1	0	0	0	0
Deney tibia 2	0	0	0	0
Deney tibia 3	1	0	0	0
Deney tibia 4	1	0	0	0
Deney tibia 5	1	0	0	0
Deney tibia 6	0	0	0	0
Deney tibia 7	3	1	1	0
Deney tibia 8	3	1	1	0
Deney tibia 9	0	0	0	0
Deney tibia 10	1	0	0	0

Tablo-6: Grupların toplam tibia Mankin skorları ve ortalamaları

Tavşan tibia	Kontrol	Deney
1.	14	0
2.	14	0
3.	10	1
4.	12	1
5.	14	1
6.	12	0
7.	9	5
8.	10	5
9.	9	0
10.	&	1
Toplam Mankin skoru	104	14
Ortalama Mankin skoru	12	1.4



Şekil-15: Normal eklem kıkırdak yapısı ve intakt Tide-Mark (Deney grubu). (HEX100)



Şekil-16: Tam dezorganize kıkırdak yapısı (Kontrol grubu), (Safranin-OX100)

Femur Medial Kondil Kıkırdak Dokusu

Kıkırdak yapısının değerlendirilmesinde; deney grubundaki tavşanların 4' ünde (%40) normal, 4' ünde (%40) yüzeysel düzensizlik, 2' sinde (%20) orta tabakaya doğru yarıklar tespit edildi. Kontrol grubundaki tavşanların 2' sinde (%22) tamamen dezorganizasyon, 4' ünde (%44) kalsifiye tabakaya doğru yarıklar, 3' ünde (%33) ise derin tabakaya doğru yarıklar gözlemlendi.

Hücresel değerlendirilmesinde; deney grubundaki tavşanların 8' inde (%80) normal hücre, 2' sinde (%20) ise yaygın hipersellülerite tespit edildi. Kontrol grubundaki tavşanların 5' inde (%60) klonlaşma, 4' ünde (%40) hiposellülerite gözlemlendi

Safranin-O ile boyanmanın değerlendirilmesinde; deney grubundaki tavşanların 8' inde (%80) normal (Şekil-17), 1' inde (%10) hafif derecede düşük, 1' inde (%10) ise orta derecede düşük boyanma tespit edildi. Kontrol grubundaki tavşanların 2' sinde (%22) boyanma olmadığı, 7' sinde (%80) ileri derecede düşük boyanma (Şekil-18) görüldü.

Tidemark bütünlüğünün değerlendirilmesinde; deney grubundaki tavşanların 10' unda (%100) bütünlük sağlam tespit edildi. Kontrol grubundaki tavşanların 5' inde (%60) damarlar tarafından geçilmiş, 4' ünde (%40) sağlam olduğu tespit edildi.

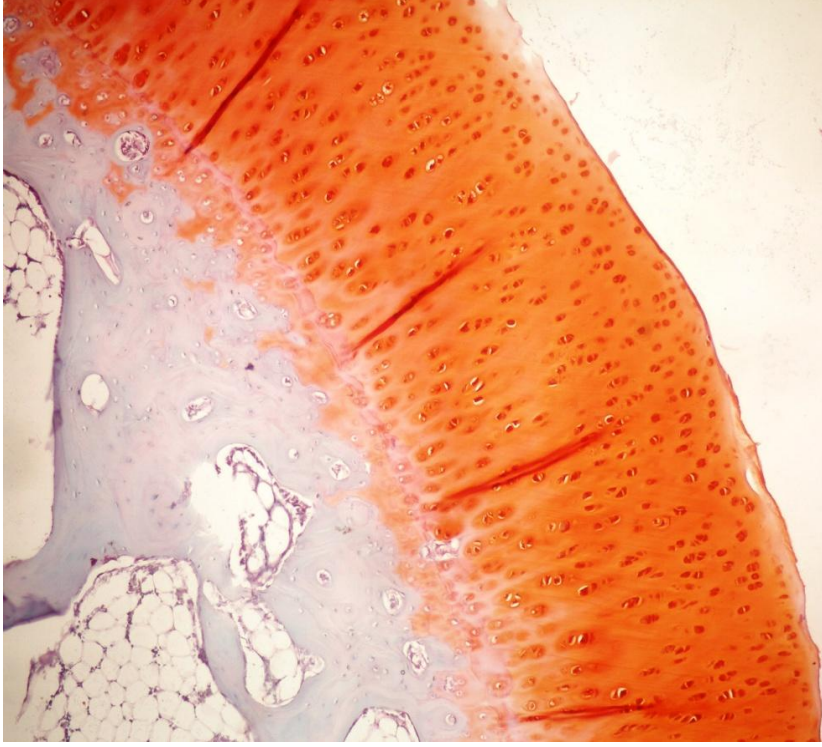
Deney ve kontrol grubundaki tüm tavşanların femur medial kondil eklem kıkırdaklarının almış olduğu histolojik skorlar tablo-7' de ayrıntılı şekilde verilmiştir. Grupların toplam Mankin skorları ve bu skorların ortalamaları ise tablo-8' de verilmiştir.

Tablo-7: Tüm tavşanların femur medial kondil eklem kıkırdaklarının almış olduğu ayrıntılı histolojik skorlar.

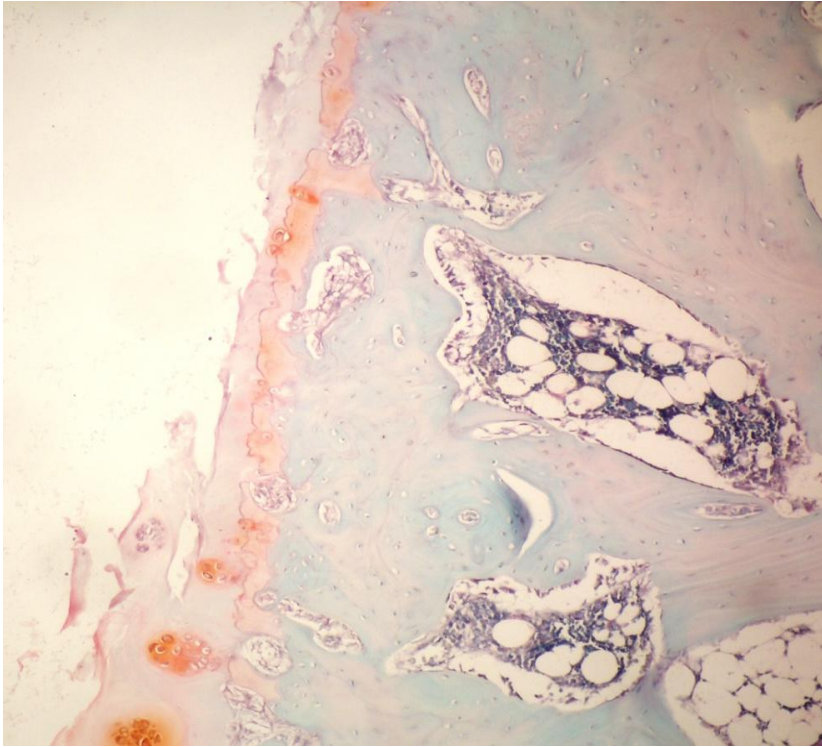
Tavşan femur	Yapı	Hücreler	Safranin-O	Tidemark
Kontrol femur 1	6	3	4	1
Kontrol femur 2	6	3	4	1
Kontrol femur 3	4	2	3	0
Kontrol femur 4	5	3	3	1
Kontrol femur 5	5	2	3	1
Kontrol femur 6	5	3	3	1
Kontrol femur 7	5	2	3	0
Kontrol femur 8	4	2	3	0
Kontrol femur 9	4	2	3	0
Deney femur 1	0	0	0	0
Deney femur 2	1	0	0	0
Deney femur 3	0	0	0	0
Deney femur 4	1	0	0	0
Deney femur 5	1	0	0	0
Deney femur 6	1	0	0	0
Deney femur 7	3	1	1	0
Deney femur 8	3	1	2	0
Deney femur 9	0	0	0	0
Deney femur 10	1	0	0	0

Tablo-8: Grupların toplam femur Mankin skorları ve ortalamaları.

Tavşan femur	Kontrol	Deney
1.	14	0
2.	14	1
3.	9	0
4.	12	1
5.	11	1
6.	12	1
7.	12	5
8.	9	6
9.	9	0
10.	&	0
Toplam Mankin skoru	102	15
Ortalama Mankin skoru	11	1.5



Şekil-17: Safranin-O ile normal boyanma (Deney grubu), (Safranin-OX100).

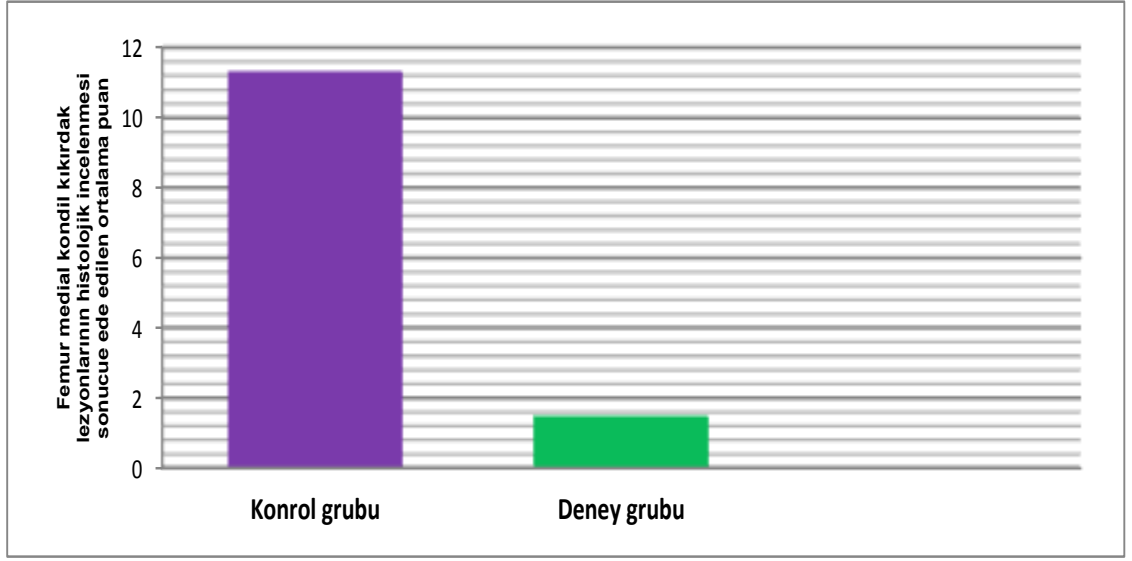


Şekil-18: Safranin-O ile boyanmada belirgin azalma (Konrol grubu), (Safranin-OX100).

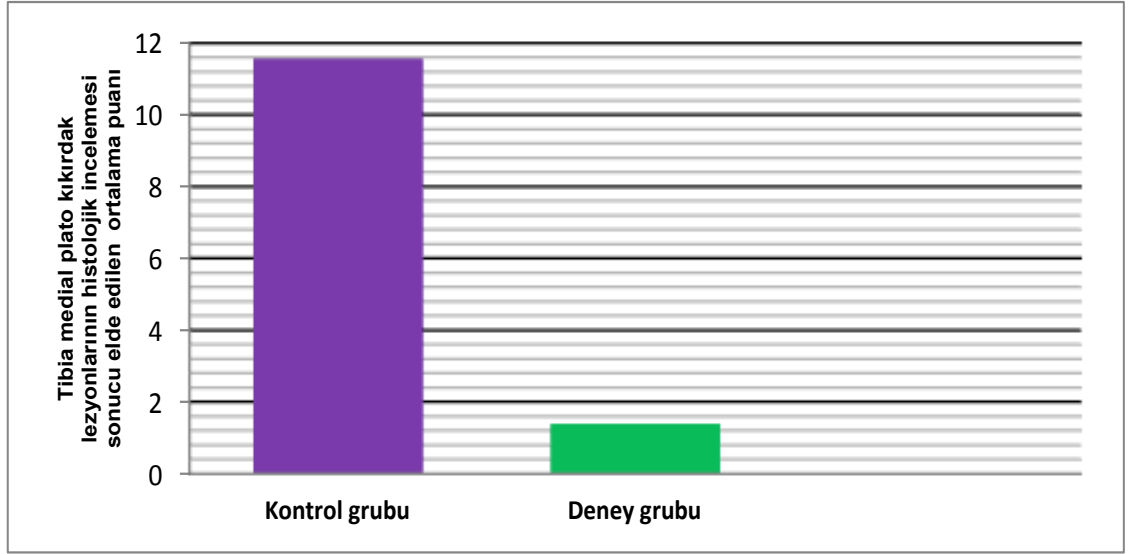
Diz eklemi medial kompartmanı kıkırdak dokusunun lezyonlarının histolojik ve histokimyasal evrelemesinde kullanılan Mankin derecelendirme sistemine göre; kıkırdağın yapısı, hücresel değişiklikleri, safranin-O tutulumu ve tidemark yapısındaki bozukluğun incelenmesi sonucunda; femur medial kondilinde gelişen lezyonların değerlendirilmesiyle elde edilen toplam puan kontrol grubunda ortalama 11.33 ± 0.667 , deney grubunda 1.5 ± 0.687 iken, tibia medial plato kıkırdak dokuda gelişen lezyonların değerlendirilmesiyle elde edilen toplam puan kontrol grubunda ortalama 11.56 ± 0.709 , deney grubunda ise 1.40 ± 0.618 olarak tespit edildi (Tablo-9), (Şekil-19, 20). Femur medial kondil ve tibia medial plato kıkırdak dokusu için elde edilen puanlar gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, kontrol grubu ile deney grubu arasında anlamlı fark saptandı ($p < 0,05$).

Tablo 9: Mankin evreleme sistemine göre diz eklemi medial kompartman kıkırdak lezyonlarının histolojik ve histokimyasal değerlendirilmesi ile gruplar arasında elde edilen toplam puanların ortalaması.

	Femur medial kondil (ortalama puan)	Tibia medial plato (ortalama puan)
Kontrol grubu	11.33 ± 0.667	11.56 ± 0.709
Deney grubu	1.5 ± 0.687	1.40 ± 0.618



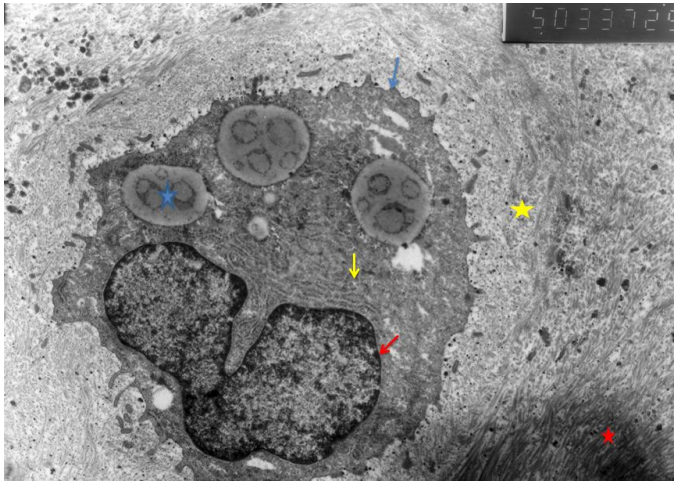
Şekil-19: Diz eklemi femur medial kondil kırıldak dokusu lezyonlarının histolojik inceleme sonucu elde edilen ortalama puanlarının gruplar arasında karşılaştırılması.



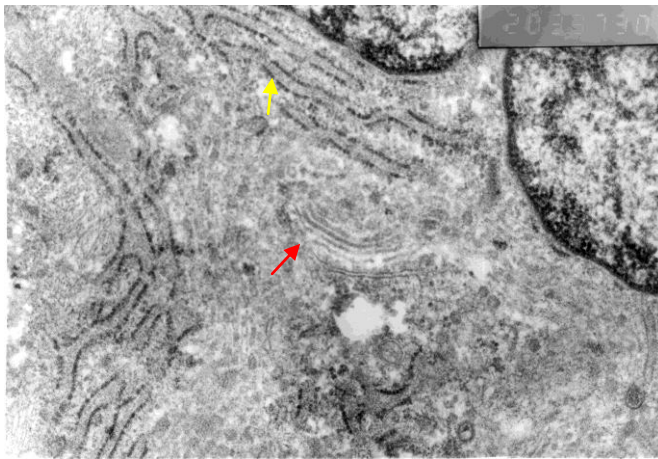
Şekil-20: Diz eklemi tibia medial plato kırıldak dokusu lezyonlarının histolojik inceleme sonucu elde edilen ortalama puanlarının gruplar arasında karşılaştırılması.

Elektron Mikroskop Bulguları

Deney grubu diz eklemi medial kompartman kıkırdak dokularının orta tabakaları elektron mikroskobu ile hücresel düzeyde incelendi. Kollajen fibriller düzenli ve homojen yapıdaydı. Proteoglikan partikülleri ve fibrillerinden oluşan teritoryal matriksle çevrili tipik yuvarlak kondrositler görüldü. Endoplazmik retikulum sağlam kıkırdak dokusundakine benzer yapıdaydı. Golgi yapısı düzenliydi (Şekil-21, 22).

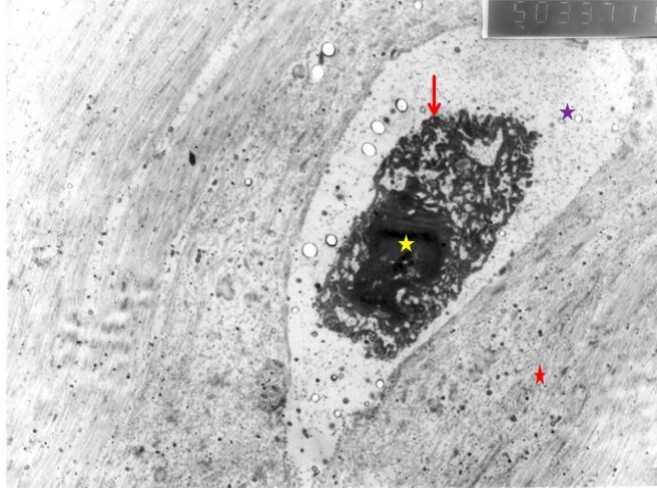


Şekil-21: Deney grubu kondrosit hücresi (Mavi yıldız: Yağ granülü, Sarı yıldız: Teritoryal matriks, Kırmızı yıldız: İnterteritoryal matriks, Mavi ok: Kondrosit zarı, Sarı ok: Granüllü endoplazmik retikulum, Kırmızı ok: Çekirdek zarı), (x5000).

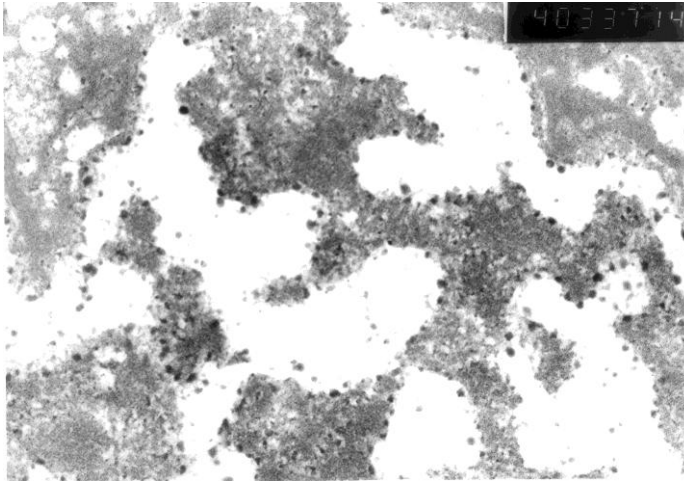


Şekil-22: Deney grubu elektron mikroskopik görüntü (Sarı ok: Endoplazmik retikulum, Kırmızı ok: Golgi kompleksi), (x20000).

Kontrol grubu diz eklemi medial kompartman kıkırdak dokularının orta tabakalarının incelenmesinde ise kollajen lifleri düzensiz ve parçalı olarak izlendi. Kondrosit sayısı belirgin olarak azalmıştı. Perisellüler alanda hale görünümü mevcuttu. Piknotik çekirdekler görüldü (Şekil-23). Golgi yapısı görülemedi. Birçok kondrositte endoplazmik retikulumda sakküler yapılar görüldü (Şekil-24).



Şekil-23: Kontrol grubu elektron mikroskopik görüntü (Mor yıldız: Perisellüler hale, Sarı yıldız: Piknotik çekirdek, Kırmızı yıldız: Terterritoryal matris, Kırmızı ok: Kondrosit zarı), (x5000).



Şekil-24: Kontrol grubu elektron mikroskopik görüntü (Granüllü endoplazmik retikulumda sakküler görünüm), (x40000).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Osteoartritin patogenezinde etkili olan katabolik sitokinlerin matriksmetalloproteinazları (MMP) aktiveşirmesi sonucu oluşacak kırıktdak yıkımını engelleyebilecek veya matriks sentezini artıracak birçok farklı ajanın etkileri deneysel OA modelinde araştırılmıştır. Son yıllarda birçok araştırmada, MMP inhibisyonu üzerine yoğunlaşmış olup lipit profiline etkileri yanında antiinflamatuvar ve immunmodölatör özellikleri tespit edilen statin grubu ilaçların deneysel osteoartrit modelinde kullanılarak bu tür etkilerinin ortaya konulması gündeme gelmiştir (6, 46, 65-70).

Kamio ve ark. (67) insan akciğer fibroblast hücre kültüründe yaptıkları çalışmada, atorvastatinin MMP-1, 3, 9 düzeylerinde azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Lazzerini ve ark. (6) ise IL-1 β ile uyarılmış insan kondrositlerinde simvastatinin MMP-3 düzeylerinde azalmaya yol açtığını tespit etmişlerdir. Barter ve ark. (66) hayvan modeli üzerinde yaptıkları simvastatin çalışmasında IL-1 inhibisyonu sonucu MMP -1, -2, -13, -9 düzeylerinde azalma bildirmişlerdir. Erdem ve ark' nın (68) fare dizlerinde yapmış oldukları çalışmada ise simvastatinin MMP-3 düzeyinde azalmaya yol açtığını göstermişlerdir.

İleri düzeydeki moleküler çalışmalara rağmen osteoartrit fizyopatolojisi bugün hala kesin olarak bilinmemekle birlikte, sadece dejeneratif bir hastalık olmadığı, hastalığın patogenezinde yapım ve yıkımla beraber ilerleyen inflamatuvar mediyatörlerin, hastalığın progresyonunda etkili olduğu, son zamanlarda yapılan deneysel çalışmalar ile gösterilmiştir (37,71). Bu inflamatuvar süreçte özellikle IL-1, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler ve kırıktdak ekstraselüler matriks (ESM) yıkımına yol açan MMP' ler önemli rol oynamaktadır.

Statinlerin antiinflamatuvar etkilerinin gösterildiği birçok çalışma mevcuttur (4, 59, 72-79). Ferro ve ark. (74) hiperkolesterolemi sebebiyle statin tedavisi uygulanan hastalarda IL-1 β ve TNF- α düzeylerinde azalma olduğunu göstermişlerdir. Yokota ve ark. (4) ise simvastatinin TNF- α ile

uyarılmış fibroblast benzeri sinovisitlerden IL-6, -8 üretimini azaltma yönünde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ascer ve ark (76) hiperkolesterolemi sebebiyle atorvastatin ve simvastatin tedavisi uygulanan hastalarda dolaşımdaki IL-1 β ve IL-6 düzeylerinde belirgin olarak azalmaya yol açtığını tespit etmişlerdir.

Yaptığımız literatür incelemelerinde statinlerin proteoglikanların yıkımında etkili olan inflamatuvar mediyatörleri ve MMP' leri inhibe ederek kondroprotektif etkilerinin ışık mikroskobu ile yapılan çalışmalar ile araştırıldığı görülmüştür (4, 6, 7). Ancak elektron mikroskobu ile yapılan kıkırdak koruyucu etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlamadık. Her ne kadar bizim çalışmamızda MMP ve interlökin düzeyleri değerlendirilmemiş olsa da statinlerin bu olumlu etkileri göz önünde bulundurularak tavşanlarda oluşturulan deneysel diz osteoartrit modelinde kıkırdak koruyucu etkilerini ışık ve elektron mikroskopları ile inceleyip hücre içi ve dışındaki değişiklikleri değerlendirdik.

Osteoartrit ile ilgili deneysel çalışmaların en büyük sıkıntısı, insandaki patofizyolojiyi tama yakın taklit eden bir model ortaya koyamamaktır. Deney hayvanlarının kıkırdağında hasar yaratan mekanik ya da kimyasal travmalar model olarak tanımlanmıştır (81, 82). Kısa veya uzun dönem eklem immobilizasyonu, menisektomi, ön çapraz bağ kesilmesi hayvan deneylerinde osteoartritik tablo oluşturan yöntemlerdendir (83, 84). Ön çapraz bağın kesilmesi ile eklem stabilizasyonu azaltılıp, biyomekanik yüklenmeleri değiştirilerek deneysel osteoartrit oluşturulur. Bu yöntemin uygulanması kolay, komplikasyonu az olup insandakine benzer özellikte osteoartritik değişiklikler geliştirmesi ve literatürde sıklıkla kullanılan bir yöntem olmasından dolayı biz de çalışmamızda tavşanlarda ön çapraz bağın kesildiği modeli kullandık (85, 86).

Literatürde tavşan diz modellerinde ön çapraz bağın kesilmesi sonrası erken dönem osteoartritik değişikliklerin gelişmesi için gereken sürenin genellikle 6-8 ile 8-16 hafta arasında olduğu belirtilmektedir (87, 83). Çalışmamızda deneysel OA modelinin gelişmesi için 12 hafta kullanılmış olup bu süre sonunda incelenen kontrol grubunda eklem kıkırdağındaki tüm tabakalarda dejeneratif değişikliklerin geliştiği tespit edilmiştir.

Akasaki ve ark.'nın (7), oluşturdukları deneysel osteoartrit modelinde eklem içi verilen mevastatinin 0.1mg/ml - 0.5 mg/ml doz aralığında eklem kıkırdağında morfolojik ve histolojik olarak düzelmeye yol açtığı gösterilmiştir. Çalışmamızda da denek grubu diz eklem içine 100 ml serum fizyolojik içerisine 40 mg atorvastatin eklenerek elde edilen karışımdan 0,4 mg/ml/kg olacak şekilde uyguladık.

Deneysel osteoartrit kıkırdak dokularının histopatolojik değerlendirilmesi için kullanılan yöntem kapsamlı, uygulanabilir ve aynı zamanda sadece temel histolojik bilgiye sahip araştırmacılar için kullanılabilir olmalıdır. Tüm yarı kantitatif histolojik skorlama sistemleri gözlemci bağımlı ve dolayısıyla subjektiftir (88, 89, 90). Mankin histopatolojik evrelemesine göre normal eklem kıkırdağı için beklenen puan aralığı 0-1 kabul edilmektedir. Hafif, orta, şiddetli osteoartritik değişiklikler için beklenen puan aralıkları ise sırasıyla 2-5, 6-9, 10-14 olarak belirtilmektedir (63, 64). Histolojik derecelendirme ile hastalığın evresi arasında doğru orantı vardır (91). Akasaki ve ark.(7) ön çapraz bağı keserek oluşturdukları deneysel osteoartrit modelinde eklem içi mevastatin uygulanan ve uygulanmayan dizleri histolojik olarak Mankin evrelemesine, makroskopik evrelemeyi ise Pelletier (61) ile uyumlu olan skorlama sistemine göre değerlendirmişlerdir. Statin uygulanan grupta, toplam Mankin skoru ve makroskopik evreleme skorunun daha düşük seviyede kaldığı, eklem kıkırdağında morfolojik ve histolojik olarak düzelmeye yol açtığı gösterilmiştir. Biz de çalışmamızda histolojik evreleme olarak Mankin, makroskopik evreleme için Pelletier değerlendirme sistemini kullandık.

Çalışmamızda diz eklemi medial kompartmanı kıkırdak dokusunun lezyonlarının makroskopik değerlendirilmesinde: Deney grubunda hiçbir tavşanda ileri evre osteoartrit saptanmazken, kontrol grubunda ise tüm tavşanlarda ileri ve orta evre osteoartrit saptandı ($p<0,05$).Histolojik değerlendirilmesinde: Femur medial kondil ve tibia medial plato kıkırdak dokusu için elde edilen puanlar deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Deney grubunda diz eklemi medial kompartman kıkırdak dokularının beklenen puan

aralıklarına göre % 80' i normal olarak bulundu. % 20' sinde ise hafif derecede osteoartritik değişiklikler gözlemlendi. Kontrol grubunun ise % 28' inde orta derece, % 72' sinde ileri derecede osteoartritik değişiklikler gözlemlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda statinlerin histolojik ve histokimyasal değerlendirilmesinde de anlamlı derecede etkili olduklarını tespit ettik.

Histolojik olarak, hücreler arası matriksteki proteoglikan miktarının gösterilmesi safranin-O ile boyanarak hazırlanan preparatların incelenmesiyle değerlendirilebilir. Lorenz ve ark. yaptıkları çalışmada; osteoartritin metakromazi kaybı ile kendini gösterdiğini saptamışlardır (92). Biz de çalışmamızda, safranin-O ile boyanma yönünden yaptığımız değerlendirmede kontrol grubunda metakromazi kaybının anlamlı derecede fazla olduğunu belirledik ($p < 0,05$).

Yamamoto ve ark.' nın (93) siyah farelerde yaptıkları çalışmada kıkırdak dokusundaki dejenerasyonun yüzeysel tabakadan başlamadığını, ilk değişikliklerin orta tabakada görüldüğünü bildirmişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda kıkırdak dokusunun orta tabakasını elektron mikroskobu ile hücresel düzeyde inceledik. Statin uygulanan deney grubundaki tavşanların elektron mikroskopik değerlendirilmesinde sağlam kıkırdak dokusuyla uyumlu kondrosit ve matriks yapısı görüldü. Kontrol grubunda ise piknotik çekirdekler ve düzensiz kollajen lifleri tespit ettik.

Shakibaei ve ark.' nın (94) florokinolon grubu ilaçların kıkırdak dokusu üzerindeki etkilerini inceledikleri elektron mikroskopik çalışmada tespit ettikleri perisellüler hale görünümünün kıkırdak matriksinin dejenerasyonu ile uyumlu olduğu belirtmişlerdir. Biz de çalışmamızın elektron mikroskopik değerlendirmesinde, kondrositlerin hücre yapısının incelenmesinin yanısıra perisellüler görünümünü de inceledik. Deney grubunda incelenen kesitlerde perisellüler hale görünümü saptanmazken kontrol grubunda kondrositlerin çevresinde hale görünümünü saptadık.

Kouri ve ark. (95) fare deneysel osteoartrit modeli elektron mikroskopik çalışmalarında osteoartritin ilerlemesiyle golgi kompleksi yoğunluğunun azaldığını immun işaretleme yöntemiyle tespit etmişlerdir. Biz de çalışmamızda elektron mikroskopik değerlendirmede her ne kadar immün

boyama yapmasak da deney grubunda incelenen kesitlerde golgi kompleksini gözlemlerken kontrol grubunda değerlendirdiğimiz kesitlerde golgi kompleksine rastlamadık.

Yamamoto ve ark. (93) C57 siyah fare üzerinde yaptıkları elektron mikroskopik çalışmada kıkırdak dokusunda kollajen liflerde heterojen dizilim ve dansitesinde azalma tespit etmişlerdir. Ayrıca Kondrosit sitoplazmasındaki endoplazmik retikulumda protein granülleriyle dolu sakküler yapıları görmüşlerdir. Bu durum aktif protein sentezini göstermekle birlikte düz endoplazmik retikulumdan golgi kompleksine protein transportunun bozulduğunu göstermekte ve bunun da glikozaminoglikanların (GAG) yapım ve salınımını bozarak osteoartritin ilerlemesine neden olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da elektron mikroskopik değerlendirmede incelenen kesitlerde kontrol grubunda endoplazmik retikulumda sakküler yapılar görülmesine karşın, deney grubunda değerlendirdiğimiz kesitlerde endoplazmik retikulumda sakküler yapılar görülmedi.

Sonuç olarak deneysel osteoartrit modelinde kıkırdak dokunun makroskopik, ışık ve elektron mikroskopik değerlendirmesinde, statinin kıkırdak dokudaki kondroprotektif etkisinin varlığını tespit ettik. Elektron mikroskopik olarak hücresel düzeyde elde ettiğimiz bulgulara göre; statinin kondroprotektif etkisini endoplazmik retikulum ve golgi kompleksinin yapısını koruyup, proteoglikanların yapımı ve salınımının devamlılığını sağlayarak etkili olduğu kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Sarıdoğan ME. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Romatolojik Hastalıklar Sempozyum Dizisi. 2003;34:11-8.
2. Hatice B. Current Review On Osteoarthritis In Turkey And The World; Epidemiology And Socioeconomic Aspect. Turk Geriatr. Derg 2001;14:7-14.
3. Hauser RA. The Deterioration of Articular Cartilage in Osteoarthritis by Corticosteroid Injections. JOP 2009;2:107-23
4. Baker JF, Walsh P, Mulhall KJ. Statins: a potential role in the management of osteoarthritis?. Joint Bone Spine. 2011;78:31-4.
5. Verbruggen G. Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases. Rheumatology 2006;45:129-38
6. Lazzerini PE, Capecchi PL, Nerucci F. Simvastatin reduces MMP-3 level in interleukin 1beta stimulated human chondrocyte culture. Ann Rheum Dis 2004;63:867-9.
7. Akasaki Y, Matsuda S, Nakayama K et al. Mevastatin reduces cartilage degradation in rabbit experimental osteoarthritis through inhibition of synovial inflammation. Osteoarthritis Cartilage. 2009;17:235-43.
8. Brinker M. R, O'Connor D. Eklemler . In: Yetkin H, Yazıcı M (Çeviri editörleri) Miller' in Ortopedi Kitabı 4.Baskı. Ankara, Adya; 2006:44-66.
9. Williams III RJ. Articular cartilage basics. In: Cartilage Repair Strategies 1th edition. New Jersey, Humana Press Inc, 2007.
10. Buckwalter JA. Ortopedi ve Kas-İskelet Sistemi. In: Alpaslan AM (Çeviri editörü) Turek Ortopedi İlkeler ve Uygulamaları 6.Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri, 2009:26-31.
11. Tyyni A, Karlsson J. Biological treatment of joint cartilage damage. Scand J Med Sci Sports 2000;10:249-65.
12. Vincent DP, Arthritic Disorders. In: Green WB (ed) Netter's Orthopaedics 1st edition. Philadelphia, Saunders Elsevier; 2006
13. Klein TJ, Malda J, Sah RL et all. Tissue engineering of articular cartilage with biomimetic zones. Tissue Eng 2009;15:143-57.
14. Recht MP, Disler DG. Articular Cartilage: Structure and Magnetic Resonance Imaging. In: Resnick D.(ed) Internal Derangements of Joints 2nd edition. Philadelphia, Saunders Elsevier;2007
15. Tatari H. The structure, physiology, and biomechanics of articular cartilage: injury and repair. Acta Orthop Traumatol Turc 2007;41:1-5
16. Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration; basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. Am J Sports Med 2005;33:295-306.
17. Pearle AD, Warren RF, Rodeo SA. Basic Science of Articular Cartilage and Osteoarthritis. Clin Sports Med 2005;24:1-12
18. Kumar P, Oka M, Toguchida J.et all. Role of uppermost superficial surface layer of articular cartilage in the lubrication mechanism of joints. J Anat 2001;199:241-50

19. Poole AR, Pidoux I, Reiner A, Rosenberg L. An immunoelectron microscope study of the organization of proteoglycan monomer, link protein, and collagen in the matrix of articular cartilage. *J Cell Biol.* 1982;93:921-37.
20. Heinegard D, Bayliss M, Lorenzo P. Pathogenesis of Structural Changes in The Osteoarthritic Joint. In: Brand KD, Doherty M, Lohmander LS (eds) *Osteoarthritis 2nd edition.* New York, Oxford University Press;2003
21. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 1998;47:477-86.
22. Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol.* 2001;12:69-78.
23. Jeffrey. Imaging hyaline cartilage. *Br J Radiol* 2003;76:777-87.
24. Roughley PJ, The Structure and function of cartilage proteoglycans , *Eur Cell Mater* 2006;12:92-101.
25. Taşkıran D. Biochemical markers in cartilage injury and repair. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2007;41:6-12.
26. Bilgili H, Atay OA, Captug O ve ark. Treatment of osteoarthritis with sodium hyaluronate: an experimental study on rabbits. *Medycyna Wet.* 2008;64: 175-78.
27. Nagase H, Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274:21491-4.
28. Aksun AA, Özmen D, Bayındır O. Metalloproteinases, Their Inhibitors And Related Physiological And Pathological Conditions. *T Klin J Med Sci* 2001;21:332-42
29. Evans JD, Ghaneh P, Kawesha A, Neoptolemos JP. Role of Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. *Digestion* 1997;58:520-8.
30. Close DR. Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:62-7.
31. Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ et al. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:8154-8.
32. Sukhova GK, Schönbeck U, Rabkin E et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation* 1999;99:2503-9.
33. Mohtai M, Smith RL, Schurman DJ et al. Expression of 92-kD type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin 1. *J Clin Invest* 1993;92:179-85.
34. Puzas JE, Landeau JM, Tallents R. Degradative pathways in tissues of the temporomandibular joint. Use of in vitro and in vivo models to characterize matrix metalloproteinase and cytokine activity. *Cells Tissues Organs* 2001;169:248-56.
35. Sandya S, Achan MA, Sudhakaran P. Multiple Matrix Metalloproteinases In Type II Collagen Induced Arthritis. *Indian JCB* 2009;24:42-8.

36. Hashimoto M, Nakasa T, Hikata T, Asahara H. Molecular network of cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Med Res Rev* 2008;28:464-81.
37. Cesare PE, Abramson SB, Samuels J. Pathogenesis of Osteoarthritis. cartilage, bone, and heritable connective tissue disorders. In: Firestein GS (ed) *Kelley's Textbook of Rheumatology* 8th edition. Philadelphia, Saunders Elsevier; 2008.
38. Doral MN, Dönmez G, Atay ÖA ve ark. Dejeneratif eklem hastalıkları. *TOTBİD Dergisi* 2007;6:56-65.
39. Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, Evans C. Nitric-Oxide Mediates Suppression of Cartilage Proteoglycan Synthesis by Interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200:142-8.
40. Järvinen TA, Moilanen T, Järvinen TL, Moilanen E. Nitric oxide mediates interleukin-1 induced inhibition of glycosaminoglycan synthesis in rat articular cartilage. *Mediators Inflamm.* 1995;4:107-11.
41. Moreland LW. Intraarticular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther* 2003;5:54-67.
42. Abramson SB. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10:2.
43. Goldring MB. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep* 2000;2:459-65.
44. Krasnokutsky S, Samuels J, Abramson SB. Osteoarthritis in 2007. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2007;65:222-8.
45. Taşkiran E, Taşkiran D, Kutay FZ, Lök V. Sinoviyal sıvıdaki kırıldak matriks yıkım ürünlerinin osteoartrit olgularının erken tanı ve izlenimindeki önemi. *Acta Orthop Traumatol Turc* 1995;29:455-8.
46. Abeles AM, Pillinger MH. Statins as Antiinflammatory and Immunomodulatory Agents : a future in rheumatologic therapy? *Arthritis Rheum* 2006;54:393-407.
47. Yudoh K, Karasawa R. Statin prevents chondrocyte aging and degeneration of articular cartilage in osteoarthritis (OA). *Aging* 2010; 2: 990–8.
48. Corsini A, Bellosta S, Baetta R. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther* 1999;84:413-28.
49. Demirtas S, Vatan MB, Çakar MA ve ark. Statinlerin Pleotropik Etkileri. *AİBÜ İzzet Baysal Tıp Fakültesi Dergisi* 2010;5;10-14.
50. Smith DA, Galin I. Statin therapy for native and peri-interventional coronary heart disease. *Curr Mol Med.* 2006;6:589–602.
51. Kwak BR, Mulhaupt F, Mach F. Atherosclerosis: anti-inflammatory and immunomodulatory activities of statins. *Autoimmun Rev* 2003;2:332-8.
52. Maher BM, Dhonnchu TN, Burke JP et all. Statins alter neutrophil migration by modulating cellular Rho activity-a potential mechanism for statins-mediated pleotropic effects?. *J Leukoc Biol.* 2009;85:186-93.

53. Kaneider NC, Reinisch CM, Dunzendorfer S. Induction of apoptosis and inhibition of migration of inflammatory and vascular wall cells by cerivastatin. *Atherosclerosis* 2001;158:23-33.
54. Bu DX, Griffin G, Lichtman AH. Mechanisms for the anti-inflammatory effects of statins. *Curr Opin Lipidol* 2011;22:165-70.
55. Barsante MM, Roff  E, Yokoro CM et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. *Eur J Pharmacol.* 2005;516:282-9.
56. Molloy KJ, Thompson MM, Schwalbe EC. Comparison of Levels of Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitor of Metalloproteinases, Interleukins, and Tissue Necrosis Factor in Carotid Endarterectomy Specimens from Patients on Versus Not on Statins Preoperatively. *Am J Cardiol.* 2004;94:144-6.
57. Pillinger MH, Marjanovic N, Kim SY et al. Matrix metalloproteinase secretion by gastric epithelial cells is regulated by E prostaglandins and MAPKs. *J Biol Chem* 2005;280:9973-9.
58. Kim SE, Thanh Thuy TT, Lee JH et al. Simvastatin inhibits induction of matrix metalloproteinase-9 in rat alveolar macrophages exposed to cigarette smoke extract. *Exp Mol Med.* 2009;41:277-87.
59. Leung BP, Sattar N, Crilly A et al. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. *J Immunol* 2003;170:1524–30.
60. Simopoulou T, Malizos KN, Poultsides L et al. Protective effect of atorvastatin in cultured osteoarthritic chondrocytes. *J Orthop Res.* 2010;28:110-5.
61. Pelletier JP, Fernandes JC, Brunet J et al. In vivo selective inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 in rabbit experimental osteoarthritis is associated with a reduction in the development of structural changes. *Arthritis Rheum* 2003 ;48:1582-93.
62. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 1971;53: 523-37.
63. Ostergaard K, Andersen CB, Petersen J, Bendtzen K, Salter DM. Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints. *Ann Rheum Dis.* 1999;58: 208-13.
64. Fuerst M, Bertrand J, Lammers L et al. Calcification of articular cartilage in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60:2694-703.
65. Turner NA, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. Simvastatin inhibits MMP-9 secretion from human saphenous vein smooth muscle cells by inhibiting the RhoA/ROCK pathway and reducing MMP-9 mRNA levels, *FASEB J.* 2005;19:804-6.
66. Barter MJ, Hui W, Lakey RL. Lipophilic statins prevent matrix metalloproteinase-mediated cartilage collagen breakdown by inhibiting protein geranylgeranylation, *Ann Rheum Dis.* 2010;69:2189-98.
67. Kamio K, Liu XD, Sugiura H. Statins inhibit matrix metalloproteinase release from human lung fibroblasts. *Eur Respir J.* 2010;35:637-46.

68. Aktas E, Sener E, Gocun PU. Mechanically induced experimental knee osteoarthritis benefits from anti-inflammatory and immunomodulatory properties of simvastatin via inhibition of matrix metalloproteinase-3. *J Orthop Traumatol*. 2011;12: 145–51.
69. Luan Z, Chase AJ, Newby AC. Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:769-75.
70. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 2001;103:276-83.
71. Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* 2005;44:7–16.
72. Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M et al. Simvastatin Has Anti-Inflammatory and Antiatherosclerotic Activities Independent of Plasma Cholesterol Lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:115-21.
73. Choi OS, Park SJ, Seo SW et al. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor, lovastatin (statin) ameliorates CCK-induced acute pancreatitis in rats. *Biol Pharm Bull*. 2005;28:1394-7.
74. Ferro D, Parrotto S, Basili S, Alessandri C, Violi F. Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:427-31.
75. Li B, Mahmood A, Lu D et al. Simvastatin attenuates microglial cells and astrocyte activation and decreases interleukin-1beta level after traumatic brain injury. *Neurosurgery*. 2009;65:179-85.
76. Ascer E, Bertolami MC, Venturinelli ML et al. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients., *Atherosclerosis*.2004;177:161-6.
77. Nawawi H, Osman NS, Annuar R, Khalid BA, Yusoff K. H. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-6 levels reflect endothelial dysfunction in patients with primary hypercholesterolaemia treated with atorvastatin. *Atherosclerosis*. 2003;169:283-91.
78. Laufs U, La Fata V, Plutzky J et al. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998;97:1129–35.
79. Gertz K, Laufs U, Lindauer U et al. Withdrawal of statin treatment abrogates stroke protection in mice. *Stroke* 2003;34:551–7.
80. Inoue I, Goto S, Mizotani K. Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in primary endothelial cells. *Life Sci* 2000;67:863-76.
81. Öztuna V. Ortopedi ve Travmatolojide Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri (Temel ilkeler, Etik unsurlar ve Modeller). *TOTBİD* 2007; 6: 1-2.
82. Pritzker KP. Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. *Ann Rheum Dis* 1994;53:406-20.

83. Papaioannou N, Krallis N, Triantafillopoulos I. Optimal timing of research after anterior cruciate ligament resection in rabbits. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2004;43:22-7.
84. Bilgen ÖF, Durak K, Külekçioğlu A, Adım ŞB. Farklı Deneysel Osteoartrit Modellerinde Erken Dönemde Gelişen Histopatolojik Değişiklikler. *Bursa Devlet Hast.Bült* 2000;16:113-8
85. Sen C, Güneş T, Saygı B ve ark. Eklem içine uygulanan hiyal.ronik asidin erken evreli osteoartritte kıkırdak koruyucu etkisi: Tavşanda deneysel çalışma. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2004;38:348-52
86. Kim JK, Kim TH, Park SW. Protective effects of human placenta extract on cartilage degradation in experimental osteoarthritis. *Biol Pharm Bull.* 2010;33:1004-10.
87. Tiraloché G, Girard C, Chouinard L et al. Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2005;52:1118-28.
88. Rutgers M, Pelt MJ, Dhert WJ, Creemers LB, Saris DB. Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18:12-23.
89. Ostergaard K, Petersen J, Andersen CB, Bendtzen K, Salter DM. Histologic/histochemical grading system for osteoarthritic articular cartilage: reproducibility and validity. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1766-71.
90. Pearson RG, Kurien T, Shu KS, Scammell BE. Histopathology grading systems for characterisation of human knee osteoarthritis--reproducibility, variability, reliability, correlation, and validity. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;19:324-31.
91. Mankin HJ, Lippiello L. Biochemical and Metabolic Abnormalities in Articular Cartilage from Osteo-Arthritic Human Hips. *J Bone Joint Surg Am.* 1970;52:424-34.
92. Lorenz H, Wenz W, Ivancic M, Steck E, Richter W. Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading. *Arthritis Res Ther.* 2005;7:156-65.
93. Yamamoto K, Shishido T, Masaoka T, Imakiire A. Morphological studies on the ageing and osteoarthritis of the articular cartilage in C57 black mice. *J Orthop Surg* 2005;13:8-18.
94. Shakibaei M, Stahlmann R. Changes in cartilage of rats after treatment with Quinolone and in Magnesium-deficient diet. *Acta Medica Iranica* 2002;40:171-76.
95. Kourí JB, Rojas L, Pérez E et al. Modifications of Golgi complex in chondrocytes from osteoarthrotic (OA) rat cartilage. *J Histochem Cytochem.* 2002;50:1333-40.

TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık Eğitimim süresince emeklerinden dolayı başta tez danışmanım Prof. Dr. Ömer Faruk Bilgen' e ve tezimin yazım aşamasında yardımlarından dolayı Doç. Dr. M. Sadık Bilgen' e ayrıca Prof. Dr. Kemal Durak, Prof. Dr. Bartu Sarısözen, Prof. Dr. Tufan Kaleli, Doç.Dr. Burak Demirağ, Yrd. Doç. Dr Burak Akesen' e emekli olan Prof. Dr. Gayyur Kurap ve Prof. Dr. Ufuk Aydınllı hocalarıma, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İlkin Çavuşoğlu' na, Patoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ulviye Yalçınkaya' ya, birlikte çalıştığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma, hastane personel ve hemşirelerine ve hayatım boyunca bana maddi ve manevi destek olan annem, babam, kardeşlerim ve özellikle asistanlığım boyunca desteğini, anlayışını ve sevgisini esirgemeyen sevgili eşime ve dünyalar güzeli kızıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

17/09/1979 tarihinde İstanbul' da doğdum. İlk öğrenimimi Şişli 19 Mayıs İlköğretim okulunda, orta ve lise öğrenimimi ise Terakki Vakfı Şişli Terakki Lisesi' nde tamamladım. 1999 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi' ne başladım ve 2005 yılında mezun oldum. 2006 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda asistanlığa başladım ve 2012 yılında uzmanlık eğitimimi tamamladım.