



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

**ERKEN DÖNEM DENEYSEL OSTEOARTRİT
MODELİNDE İNTRAARTİKÜLER UYGULANAN İNSAN
AMNİOTİK SIVISI ve HYALÜRONİK ASİTİN
KONDROPROTEKTİF ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Gökhan Kürşat KARA

UZMANLIK TEZİ

Bursa – 2007



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

**ERKEN DÖNEM DENEYSEL OSTEOARTRİT
MODELİNDE İNTRAARTİKÜLER UYGULANAN İNSAN
AMNİOTİK SIVISI ve HYALÜRONİK ASİTİN
KONDROPROTEKTİF ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Gökhan Kürşat KARA

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Ömer Faruk BİLGEN

Bursa - 2007

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TÜRKÇE ÖZET	4
İNGİLİZCE ÖZET	5
GİRİŞ	6-7
GEREÇ VE YÖNTEM	8-12
BULGULAR	13-28
TARTIŞMA VE SONUÇ	29-38
KAYNAKLAR	39-44
TEŞEKKÜR	45
ÖZGEÇMİŞ	46

ÖZET

Bu çalışmada erken dönem deneysel osteoartrit modelinde intraartiküler uygulanan İnsan Amniotik Sıvısı (İAS) ve Hyalüronik Asit'in (HA) kıkırdak ve sinovyal doku üzerine etkilerinin karşılaştırılması amaçlandı.

Osteoartrit oluşturmak amacıyla ön çapraz bağı kesilen 30 tavşan üç gruba ayrıldı. Grup I'e serum fizyolojik, Grup II'ye HA, Grup III'e İAS, birer hafta ara ile 3 kez intraartiküler uygulandı. Tavşanlar 12.haftada sakrifiye edilerek kıkırdak doku makroskopik, histopatolojik, immünohistokimyasal, sinovyal doku ise histopatolojik olarak değerlendirildi ve hücre tabakası kalınlığı ölçüldü. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Makroskopik değerlendirmede ortalama puanlar Grup I de 3,8 (3-4) , Grup II de 1,4 (0-4), Grup III te 2,3 (0-4) olarak bulundu. Grup I ile Grup II arasındaki fark anlamlıydı ($p=0.008$).

Kıkırdak doku histopatolojik değerlendirmesinde femur medial kondil için Grup I, II, III'teki değerler sırası ile ortalama 28,85 (28-30), 10,83 (2-28) ve 19,37 (10-30), tibia medial plato için ise sırasıyla ortalama 22 (16-28), 9 (0-16) ve 12,25 (4-28) olarak bulundu. Grup I'deki puanlar Grup II ve Grup III'e göre anlamlıydı ($p=0.005$).

İmmünohistokimyasal değerlendirmede grupların değerleri sırasıyla ortalama femur yüzeysel tabakada 3,86 (3-4), 1,71 (0-4) ve 1,25 (0-3) (Grup I için $p<0.05$), femur derin tabakada 2,14 (0-4) , 0,57 (0-1), 0,13 (0-1) (Grup I için $p<0.05$) iken tibia yüzeysel tabakada 2,43 (1-4), 1,14 (0-4), 0,63 (0-1) (Grup I ile Grup III arasında $p<0.05$), tibia derin tabakada 1 (0-1), 0,43 (0-3) ve 0 ($p>0.05$) olarak bulundu.

Sinovyal doku histopatolojik değerlendirmesinde gruptaki puanlar sırası ile ortalama 9,14 (1-14), 3,83 (0-9) ve 8,87 (4-13) idi. (Grup II için $p<0.05$). Sinovyal hücre tabakasının kalınlığı ise sırasıyla ortalama 28 μm (15-38), 28,3 μm (20-35) ve 36,3 μm (30-40) olarak ölçüldü. (Grup III için $p<0,05$).

Sonuç olarak, kondroprotektif etkisi HA ile karşılaştırılabilir düzeyde olan İAS'ın farklı kimyasal işlemlerden geçirilerek terapötik etkisinin artırılması ile OA tedavisinde güncel yaklaşımlarından biri olan kıkırdak koruyucu ajanlara alternatif bir yöntem olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: İnsan amniotik sıvısı, Hyalüronik Asit, Apoptoz, Caspase-3, Deneysel osteoartrit, Kıkırdak koruyucu etki

SUMMARY

COMPARISON OF CONDROPROTECTIVE EFFECT OF INTRAARTICULAR HYALURONIC ACID AND HUMAN AMNIOTIC FLUID INJECTION ON RABBIT EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIS MODEL

Purpose of this study is to compare the effect of intraarticular applied human amniotic fluid and hyaluronic acid on cartilage and synovial tissue at early stage experimental osteoarthritis.

30 rabbits whose anterior cruciate ligaments cut for osteoarthritis were divided into 3 groups. SF to Group I, HA to Group II and HAF to Group III were applied intraarticularly once for a week for 3 times. All rabbits were sacrificed at 12th week. Chondral tissues were evaluated with macroscopically, histopathologically, immunohistochemically and synovial tissues were evaluated with histopathologically. Synovial cell layer thickness was measured. Results were evaluated statistically.

Average values at macroscopic evaluation were 3,8 (3-4) at Group I, 1,4 (0-4) at Group II and 2.3 (0-4) at Group III. There was statistically acceptable difference between Group I and Group II ($p=0.008$)

Average values at histopathological evaluation of femur medial condyl cartilage tissue were 28,85 (28-30) at Group I, 10,83 (2-28) at Group II, 19,37 (10-30), at Group III. Average values for tibia medial condyl were 22 (16-28) at Group I, 9 (0-16) at Group II, 12,25 at Group III results of Group I were significantly different from Group II and Group III.

At immunohistochemical evaluation; average values for femoral superficial layers were 3,86 (3-4) at Group I, 1,71 (0-4) at Group II, 1,25 (0-3) Group III. ($p<0,05$ for Group I) average values for femoral deep layers were 2,14 (0-4) at Group I, 0,57 (0-1) at Group II, 0,13 (0-1) at Group III. ($p<0,05$ for Group I) With immunohistochemical evaluation; average values for tibial superficial layers were 2,43 (1-4) at Group I, 1,14 (0-4) at Group II, 0,63 (0-1) Group III. ($p<0,05$ between Group I and III) average values for tibial deep layers were 1 (0-1) at Group I, 0,43 (0-3) at Group II, 0 at Group III ($p>0,05$).

Key words: Human Amniotic Fluid, Hyaluronic Acid, Apoptosis, Caspase-3, Experimental Osteoarthritis, Cartilage Protect Effect

GİRİŞ

Değişen yaşam şekli ve yaşam süresinin uzaması ile görülme sıklığı artan, ağrı ve fonksiyon kaybına neden olarak aile, toplum ve ekonomiyi olumsuz yönde etkileyen, eklem kıkırdağının dejenerasyonu ile karakterize bir hastalık olan primer osteoartrit (OA) tedavisinde uygulanan lokal ve sistemik ajanlarla kıkırdaktaki hasarın gelişimini engellemek, ilerleyişini yavaşlatmak veya durdurmak amaçlanmaktadır(1).

Hücreler ve ekstrasellüler matriks arasındaki yapım-yıkım dengesinin bozulması sonucu meydana gelen OA’te matriks yapımını azaltan ya da yıkımı artıran birçok faktör tanımlanmıştır (1). Başlangıçta kıkırdak dokudaki bu dengenin bozulmasında ekstrasellüler matriks komponentlerini yıkan kollajenaz, jelatinaz, agrekanaz, elastaz ve fibronektin-yıkıcı stromelin-1 gibi matriks metalloproteinaz (MMP) enzimlerinin sorumlu olduğu belirtilirken, günümüzde kıkırdak yapısal bütünlüğünün sürdürülmesinde kondrositlerin daha etkin rol oynadığı ve normal kıkırdak dokusunda toplam volümün sadece % 5 ini oluşturan bu hücrelerdeki sayısal ve fonksiyonel kaybın OA gelişiminde ve ilerlemesinde belirleyici olduğu ileri sürülmektedir (2,3).

Osteoartrit patogenezindeki kondrosit ölümü ve bunun sonucu olarak meydana gelen sayısal azalmanın mekanizması önceleri nekroz olarak kabul edilirken son çalışmalarda bunun apoptoz ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (3-7). Normal kıkırdak dokuda %0-7 oranında olduğu bildirilen apoptozun OA gelişen kıkırdakta %44'lere kadar yükseldiği gösterilmiştir (3,8).

Programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü veya hücre intiharı olarak da belirtilen apoptoz canlı dokudaki hücre azalmasından sorumlu olan özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır(9). Çok sayıda mediatör tarafından düzenlenen apoptozda hücrenin yaşayabilirlik durumu pro-apoptotik ve anti-apoptotik ajanların oranına bağlıdır. Aspartat-spesifik sistein proteaz (caspase) enzim grubunun temel rol oynadığı apoptozda birbirini aktifleştirerek preteolitik bir kaskada neden olan 14 farklı caspase tanımlanmıştır(8). Farklı

mediatör ve sinyaller ile aktifleşen kaspaz-3 Kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleazı (CAD) serbestleşir ve apoptozun karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu gelişir (10). İnsan osteoartritik kıkırdağında Caspase-3 enziminin arttığı dolayısı ile bu enzimin immunohistokimyasal yöntemler ile tespitinin apoptoz değerlendirilmesinde belirteç olarak kullanılabilmesi invitro ve invivo çalışmalarda gösterilmiştir (11-15).

Klinik ve deneysel çalışmalarda osteoartrit progresyonunu yavaşlattığı gösterilen hyaluronik asitin (HA) etki mekanizmasını değerlendiren bir çok araştırmada, intraartiküler uygulama sonrası endojen HA yapımının arttığı, kollojen ve proteoglikan yıkımının engellendiği, kondrosit metabolizmasının değiştiği, kondrosit yıkımı ve apoptozun azaldığı gösterilmiştir (16-21). Diaz-Gallego L. ve ark (22) tavşanlarda yaptıkları deneysel OA modelinde, HA uygulanan dizlerdeki apoptozun %9.8, uygulanmayanlarda ise %14.09 oranında geliştiğini ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu tespit etmişlerdir. Echigo R. ve ark'da (23) HA uygulaması sonrası apoptozdaki azalmanın yaklaşık %50 oranında olduğunu bildirmişlerdir.

Zengin bir kompozit materyal olan insan amniotik sıvısının (İAS), kıkırdak sentezini etkileyen insulin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme hormonlarını, fibronektin, laminin ve vitronektin gibi hücrelerarası matriksin önemli glikoproteinlerini, HA ve hyalüronik asit aktive edici ajanı (HASA), kıkırdak yıkımını önleyebilecek insan fibroblast kollajenaz inhibitörü benzeri bir glikoproteini, α 2- makroglobulini ve doku metalloproteinaz inhibitörlerini (TIMP) içerdiği bildirilmiştir (24-34). Deneysel çalışmalarda İAS' nın periferik sinir, tendon, kırık iyileşmesi ve OA üzerindeki olumlu etkileri gösterilmiştir(35-40). Yarı-kantitatif yöntemler kullanılarak İAS'nın OA üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bu çalışmalarda kondroprotektif etkinliği bilinen bir ajanla karşılaştırması yapılmamıştır.

Çalışmamızda deneysel OA modelinde intraartiküler uygulanan İAS ve HA'in sinovyal ve kıkırdak doku üzerindeki etkilerini, yarı-kantitatif yöntemlere ek olarak kantitatif bir metot ile değerlendirmek ve etki güçlerini karşılaştırmak amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alınan gerekli izin sonrası Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen ağırlıkları 2500– 4000 gr arasında olan 30 adet erişkin Yeni Zelanda tavşanı kullanılarak yapılan bu çalışmada, deneysel OA oluşturmak amacı ile Yoshioka ve ark.'nın (41) tanımladığı Ön Çapraz Bağ (ÖÇB) kesilerek oluşturulan model kullanıldı.

Üç gruba ayrılan deney hayvanlarına eklem içi enjeksiyon amacıyla 0.5 ml İAS, molekül ağırlığı 700 kilodalton (kd) olan HA (HYALGAN®; Bilim İlaç San. İstanbul, Türkiye) ve serum fizyolojik uygulandı. Kullanılan İAS Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na prenatal tanı amacıyla gönderilen ve yapılan değerlendirme sonrası patoloji saptanmayan 2. trimester gebelere uygulanmış amniosentez mayinden elde edildi. Hücreden arındırmak amacıyla yüksek devirde santrifuj edilen bu materyalin, deney hayvanlarına uygulanıncaya kadar geçen süre içerisinde protein denatürasyonunu engellemek amacıyla -20°C de saklanmasına, amniosentez ile intraartiküler enjeksiyon uygulaması arasında geçen sürenin ise 24 saatten az olmasına özen gösterildi.

Cerrahi Teknik

Enfeksiyon profilaksisi için cerrahi girişimden 30 dakika önce 50 mg/kg Sefazolin Sodyum (Sefazol® Mustafa Nevzat İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye) uygulanan deney hayvanlarında anestezi amacıyla %2'lik ksilazin hidroklorür 8 mg/kg (ROMPUN®; Bayer Healthcare, Leverkusen, Germany) ve ketamin hidroklorür (KETALAR® ;Pfizer, USA) 100 mg/kg dozunda kas içine uygulandı. Sağ arka ekstremiteleri tıraş edilen tavşanların ameliyat sahası %10 povidine iodine (Batticon®; Adeka, Samsun, Türkiye) solüsyonu kullanılarak temizlendi ve steril olarak örtüldü. Ön-orta hattın yapılan longitudinal cilt insizyonu sonrası medial parapatellar artrotomi ile patella laterale disloke edildi ve yeterli açılım sağlandı. Diz tam fleksiyonda iken ön çapraz bağ kesildi. Çapraz bağın tam kat kesildiği ön çekmece testi ile

doğrulandı. Eklem boşluğu steril serum fizyolojik ile yıkandı ve eklem kapsülü 3-0 kalınlığında emilebilen iplik (Safil - Aesculap AG and CO.KG - Braun), cilt

ise 3-0 kalınlığında emilmeyen iplik (Ethilon – Ethicon – Johnson and Johnson) ile kapatıldı. Cerrahi sonrası analjezi amacıyla içme sularına 1-2 mg/kg/100 ml parasetamol konulan tavşanlar standart yem ile beslenerek kafes aktivitesine bırakıldılar.

İntraartiküler ilaç enjeksiyonu uygulaması için 30 mg/kg ketamin hidroklorür ile sedasyon sağlanan tavşanlar randomize olarak 10'arlı üç gruba ayrıldı ve yapılan cerrahi sonrası 1. haftadan itibaren birer hafta ara ile toplam üç kez 0,5 ml hacminde serum fizyolojik (Grup I), HA (Grup II) ve İAS (Grup III) uygulandı. Deney hayvanları son enjeksiyondan 8 hafta sonra yüksek doz tiopental sodyum (Pentotal, İ.E İlaç San. İstanbul, Türkiye) yardımı ile sakrifiye edildi. Cerrahi girişim uygulanan diz eklemleri sinovya, femur ve tibia eklem yüzeylerini içerecek şekilde çıkartılan tavşanlarda ÖÇB'in tam kesilip kesilmediği kontrol edildi.

Femur medial kondil kıkırdak dokusundaki dejeneratif değişikliklerin makroskopik değerlendirmesinde Pelletier ve ark.(42) tarafından tanımlanan evreleme sistemi kullanıldı (Tablo 1).

TABLO 1: Kıkırdak Doku Makroskopik Evrelemesi (42)

Evre 0	Sağlam yüzey
Evre 1	Minimal fibrilasyon veya yüzeysel sarımsak renk değişikliği
Evre 2	Erozyon yüzeysel veya orta tabaka
Evre 3	Erozyon derin tabaka
Evre 4	Erozyon subkondral kemik

Doku Hazırlanması

Deney hayvanlarının cerrahi girişim uygulanan diz eklemleri femur ve tibiaya ait eklem yüzeyleri ve sinovyal dokuyu içerecek şekilde eklem mesafesinden 2 cm uzaklıktan kesilerek çıkartıldı. Çevre yumuşak dokuların uzaklaştırılmasını takiben histopatolojik ve immunohistokimyasal inceleme için %10'luk formaldehit solüsyonunda üç gün süreyle dokuların fiksasyonu sağlandı. Takiben %10'luk formik asit solüsyonu içinde on beş gün bekletilerek dekalsifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Örnekler dehidrasyonu takiben parafin bloklara gömüldü. Rutin takip işlemleri sonrası 4 µm lik sagittal kesitler alınarak histopatolojik ve histokimyasal değerlendirme için hematoksilin-eosin ve safranin-O, immünohistokimyasal değerlendirme için caspase-3 boyası ile boyandı.

İmmünohistokimyasal yöntemle apoptotik kondrositleri değerlendirmek amacıyla yapılan caspase-3 boyama yönteminde her üç grupta parafin bloklardan elde edilen 4 µm kalınlığındaki sagittal kesitler polilizin kaplı lamlara alındı. Kesitler 50 ml sitrat tampon içinde 2x5 dakikalık periyotlar halinde 700 wattlık mikrodalga ışın altında mikrodalga fırında ışınladı. Mikrodalga fırından çıkarılan kesitler sıcak tampon içinde 20 dakika bekletildi. Primer antikor olarak Caspase 3 poliklonal antikor (Rabbit Polyclonal Antibody, CPP32 Ab-4, Neomarkers, USA) 1/100 oranında sulandırılarak 30 dakika süre ile oda sıcaklığında uygulandı. Biotin-Streptavidin amplifikasyon sistemi, horse radish peroxidase enzimi ve AEC kromojeni (LSAB universal kit, DAKO, Carpinteria , CA, USA) kullanılarak yöntem tamamlandı.

Histopatolojik Değerlendirme

Kıkırdak doku histopatolojik değerlendirmesinde, Mankin ve ark.'nın (43) tanımladığı ve Yoshimi ve ark. (19) tarafından modifiye edilen değerlendirme sistemi kullanıldı. Kıkırdağın histolojik yapısı, hücresel değişiklikler, safranin-O tutulumu, tidemark yapısı ve pannus oluşumunun derecelendirildiği bu sistemde elde edilen toplam puanlar, gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Tablo 2).

Sinovyal dokudaki değişikliklerin histopatolojik değerlendirmesinde, Yoshimi ve ark. (19) tarafından tanımlanan ve iki ana bölümden oluşan derecelendirme sistemi kullanıldı. Bu derecelendirme sisteminde sinovyal dokunun hipertrofisi, hiperplazisi ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunu değerlendiren birinci kısım puanı ile subsinovyal alanın granülasyon doku proliferasyonu, vaskülarizasyonu ve inflamatuvar hücreler tarafından infiltrasyonunu değerlendiren ikinci kısım puanı toplandı. Her üç grupta elde edilen toplam puanlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Tablo 3). Sinovyal dokunun değerlendirilmesi amacıyla sinovyal hücre tabakasının kalınlığı μm cinsinden ölçülerek üç gruptaki sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Apoptosis tayini için kullanılan ve aktif caspase 3 içeren hücreleri gösteren immunohistokimyasal boyama ile femur ve tibia kırıkdağları ayrı ayrı değerlendirilerek büyük büyütmeye yüzeyel ve derin kırıkdağ tabasındaki apoptotik hücreler sayıldı. Caspase 3 ile boyanan apoptotik kondrositlerin tüm kondrositlere oranına göre 0 ile 4 arasında puanlama yapıldı (Tablo 4).

TABLO 2. Eklem Kıkırdak Lezyonlarının Histolojik ve Histokimyasal Evrelemesi (19)

I.Yapı	
Normal	0
Hafif yüzey düzensizliği	1
Orta derecede yüzey düzensizliği	2
Ciddi yüzey düzensizliği	3
Transizyonel zonda yarık	4
Radyal zonda yarık	5
Kalsifiye zonda yarık	6
Transizyonel zon kaybı	7
Radyal zon kaybı	8
Kalsifiye zon kaybı	9
Komplet dezorganizasyon	10
II. Hücre	
1. Tanjansiyel zon	
Normal	0
Şişme	1
Hücre kaybı	2
2. Transizyonel ve radyal zon	
Normal	0
Hafif hiperselülerite	1
Orta derecede hiperselülerite	2
Ciddi hiperselülerite	3
Hafif klonlaşma	4
Orta derecede klonlaşma	5
Ciddi klonlaşma	6
Hafif hiposelülerite	7
Orta derecede hiposelülerite	8
Ciddi hiposelülerite	9
Hücrelerin kaybı	10
III. Safranin-O tutulumu	
Normal	0
Hafif azalma	1
Orta derecede azalma	2
Ciddi kayıp	3
Hiç tutulum yok	4
IV. Tidemark	
İntakt	0
Çok seviyeli	1
Belirsiz	2
Damarlanma ile bozulmuş	3
V. Pannus oluşumu	
Yok	0
Hafif	1
Orta derecede	2
Belirgin	3

Tablo 3. Sinovyal Doku Değişikliklerinin Histolojik Sınıflaması (19)

I. Sinovyalı döşeyen hücre tabakası

1. Sinovyalı döşeyen hücrelerin hiperplazisi

Normal	0
Hafif	1
Orta derecede	2
Ciddi	3

2. Sinovyalı döşeyen hücrelerin hipertrofisi

Normal	0
Hafif	1
Orta derecede	2
Ciddi	3

3. İnflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu

Normal	0
Hafif	1
Orta derecede	2
Ciddi	3

II. Subsinovyal doku

1. Granülasyon dokusunun proliferasyonu

Normal	0
Hafif	1
Orta derecede	2
Ciddi	3

2. Vaskülarizasyon

Normal	0
Hafif	1
Orta derecede	2
Ciddi	3

3. İnflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu

Normal	0
Hafif	1
Orta derecede	2
Ciddi	3

Tablo 4. Caspase 3 ile boyanan apoptotik kondrositlerin tüm kondrositlere oranına göre derecelendirilmesi

<u>%</u>	<u><i>Apoptoz puanı</i></u>
0-20	0
20-40	1
40-60	2
60-80	3
80-100	4

BULGULAR

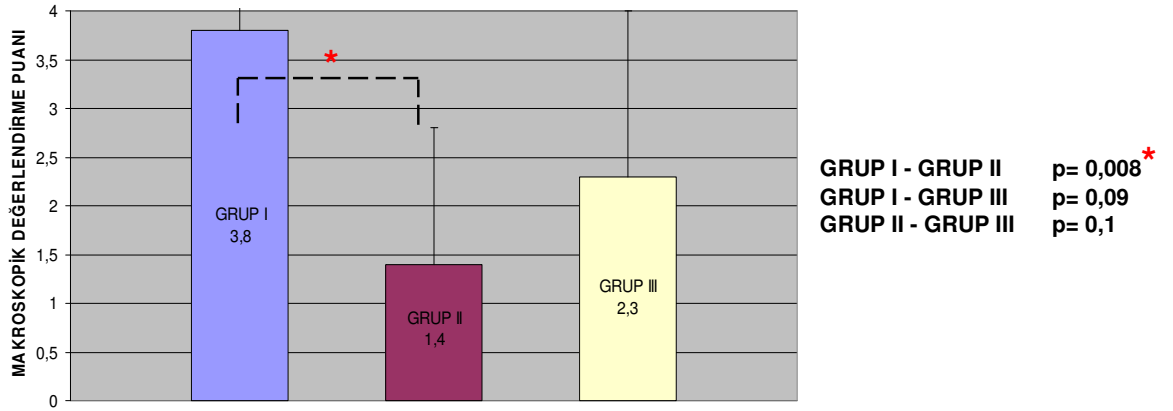
Her gruptan birer tavşan, yara yeri enfeksiyonu veya septik artrit gelişmesi nedeniyle çalışma dışı bırakıldı. Ayrıca çalışma süresince Grup I ve II'den iki, Grup III'ten ise bir tavşan öldüğü için çalışma 22 tavşanla sonuçlandırıldı (n: 22; Grup I:7, Grup II:7, Grup III:8).

Femur medial eklem yüzeyinin makroskopik değerlendirmesinde; Grup I'deki tavşanların birinde evre 3 (%14.2), 6'sında evre 4 (%85.8) dejeneratif değişiklik geliştiği tespit edilirken Grup II'deki tavşanların ikisinde evre 0 (%28.5), üçünde evre 1 (%42.8), birinde evre 3 (%14.2) birinde evre 4 (%14.2) dejeneratif değişiklik geliştiği görüldü. İnsan amniotik sıvısı uygulanan Grup III'te ise evre 0 değişiklik bir (%12.5), evre 1 değişiklik üç (%37.5), evre 4 değişiklik dört (%50) tavşanda gelişti. İleri evre kırıldak hasarı (evre 3-4), Grup I'deki 7 tavşanda da (%100) gelişirken bu hasar Grup II'de iki (%28), Grup III'te ise 4 tavşanda (%50) tespit edildi (Tablo 5). Bu sonuçların gruplar arası istatistiksel değerlendirmesinde; Grup I ile Grup II arasındaki fark anlamlı iken ($p=0.008$) Grup I ile Grup III ve Grup II ile Grup III arasındaki fark anlamsız idi ($p>0.05$) (Grafik 1).

TABLO 5: Femur Medial Kondil Eklem Yüzeyinin Makroskopik Değerlendirmesi (42)

GRUPLAR	Ortalama puan	Evre 0 – 2 (n)	Evre 3- 4 (n)	TOPLAM (n)
I	3,8 (3-4)	-	7	7
II	1,4 (0-4)	5	2	7
III	2,3 (0-4)	4	4	8

GRAFİK 1: Femur Medial Kondil Eklem Yüzeyinin Makroskobik değerlendirilmesi



Kıkırdak dokunun histopatolojik değerlendirmesi amacıyla kullanılan modifiye Mankin derecelendirme sistemine göre; femur medial kondil kıkırdak doku toplam puanı Grup I de ortalama $28,85 \pm 0,8$ (28-30), Grup II'de ortalama $10,83 \pm 9,7$ (2-28) ve Grup III'de ortalama $19,37 \pm 8,0$ (10-30) iken tibia medial plato kıkırdak dokudaki toplam puanlar sırasıyla ortalama $22 \pm 4,6$ (16-28), $9 \pm 6,0$ (0-16) ve $12,25 \pm 7,7$ (4-28) olarak tespit edildi (Tablo 6-7). Femur medial kondil ve tibia medial plato kıkırdak doku için Grup I'de elde edilen puanlar Grup II ve Grup III'teki değerlerle istatistiksel olarak karşılaştırıldığında fark anlamlı iken ($p=0.005$) Grup II ile Grup III arasındaki fark anlamsız idi ($p>0.05$) (Grafik 2-3).

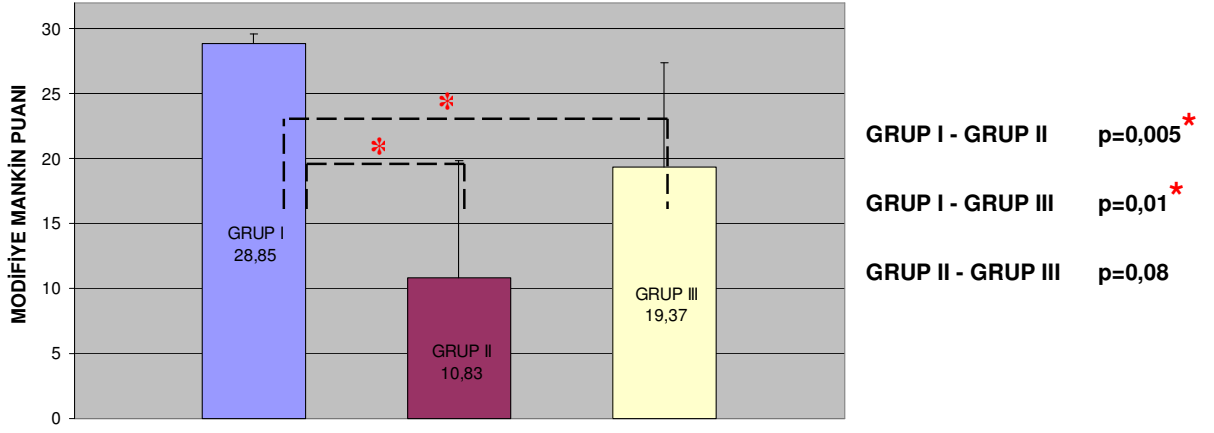
TABLO 6: Modifiye Mankin Derecelendirme Sistemine (19) Göre Femur Medial Kondili ve Tibia Medial Platosundaki Kıkırdak Doku Değerlendirilme Sonuçları

GRUP	Femur medial kondili (ort. puan)	Tibia medial platosu (ort. puan)
I	28,85 (28-30)	22 (16-28)
II	10,83 (2-28)	9 (0-16)
III	19,37 (10-30)	12,25 (4-28)

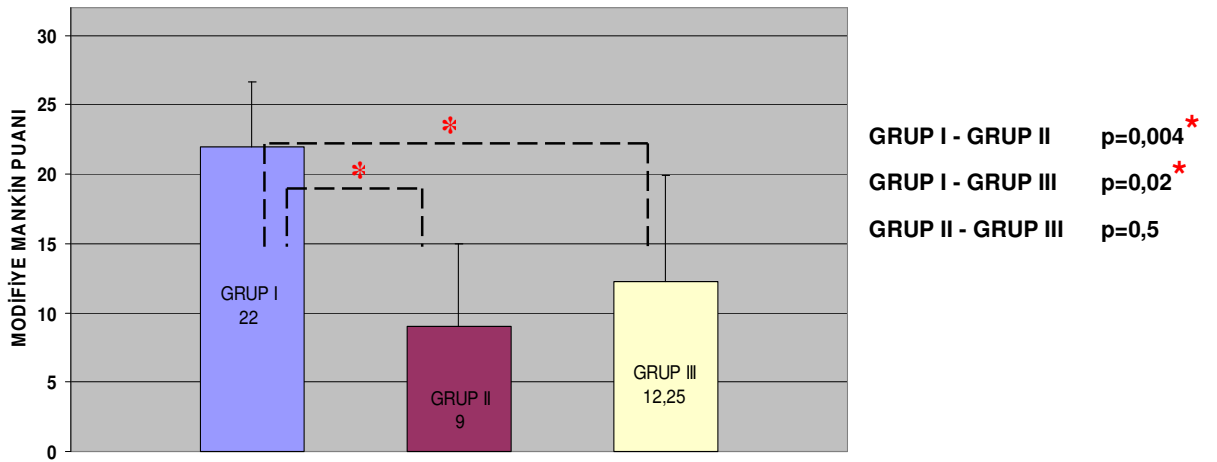
TABLO 7: Modifiye Mankin Derecelendirme Sistemine (19) Göre Femur Medial Kondili ve Tibia Medial Platosundaki Kıkırdak Doku Değerlendirilme Sonuçları

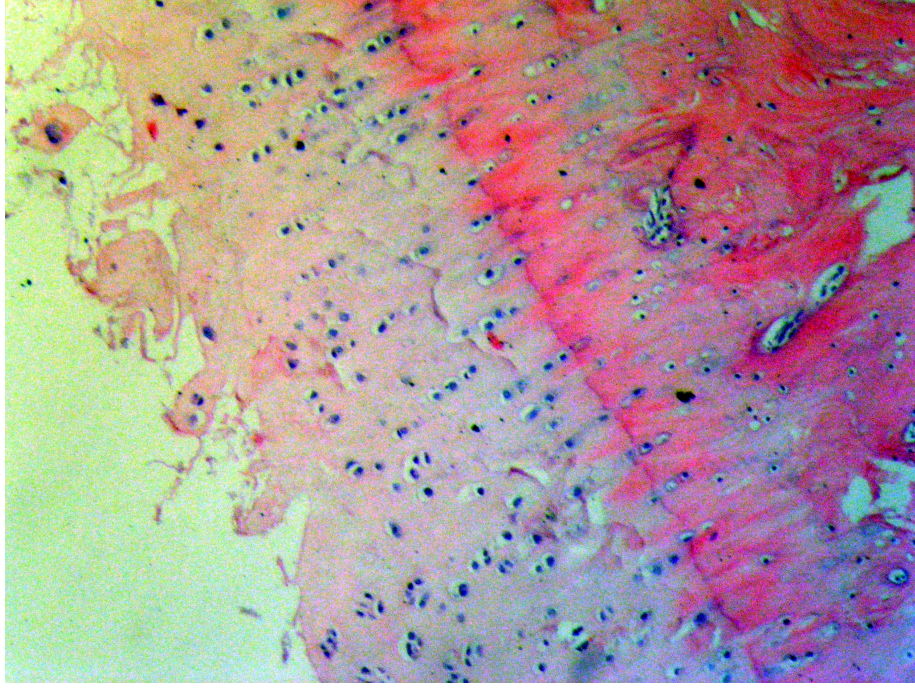
	FEMUR MEDİAL KONDİL			TİBİA MEDİAL PLATO		
	GRUPI	GRUPII	GRUPIII	GRUPI	GRUPII	GRUPIII
I.Yapı						
Normal	-	-	-	-	1	1
Hafif yüzey düzensizliği	-	2	1	-	2	2
Orta yüzey düzensizliği	-	1	1	-	4	-
Ciddi yüzey düzensizliği	-	3	2	2	-	4
Transizyonel zon yarık	-	-	-	-	-	-
Radyal zonda yarık	-	-	-	-	-	-
Kalsifiye zonda yarık	-	-	-	1	-	-
Transizyonel zon kaybı	-	-	-	-	-	-
Radyal zon kaybı	-	-	-	1	-	-
Kalsifiye zon kaybı	1	-	-	1	-	-
Komplet dezorganizas.	6	1	4	2	-	1
Toplam	7	7	8	7	7	8
II. Hücre						
1. Tanjansiyel zon						
Normal	-	2	1	-	2	1
Şişme	-	2	1	-	2	1
Hücre kaybı	7	3	6	7	3	6
Toplam	7	7	8	7	7	8
2. Transizyonel ve radyal zon						
Normal	-	-	-	-	1	-
Hafif hiperselülerite	-	2	-	-	-	1
Orta hiperselülerite	-	1	1	-	-	1
Ciddi hiperselülerite	-	-	-	-	2	-
Hafif klonlaşma	-	2	-	-	-	1
Orta klonlaşma	-	-	1	-	1	1
Ciddi klonlaşma	-	-	1	-	-	-
Hafif hiposelülerite	-	-	1	-	1	2
Orta hiposelülerite	-	1	1	2	1	-
Ciddi hiposelülerite	1	-	1	4	1	1
Hücrelerin kaybı	6	1	2	1	-	1
Toplam	7	7	8	7	7	8
III. Safranin-O tutulumu						
Normal	-	2	1	-	2	2
Hafif azalma	-	2	1	-	2	4
Orta derecede azalma	-	2	-	1	2	-
Ciddi kayıp	1	-	3	4	1	1
Hiç tutulum yok	6	1	3	2	-	1
Toplam	7	7	8	7	7	8
IV. Tidemark						
İntakt	-	5	2	3	7	5
Çok seviyeli	-	1	5	2	-	2
Belirsiz	7	1	1	2	-	1
Damarlanma	-	-	-	-	-	-
Toplam	7	7	8	7	7	8
V. Pannus oluşumu						
Yok	2	7	3	5	7	7
Hafif	2	-	3	2	-	1
Orta derecede	2	-	2	-	-	-
Belirgin	1	-	-	-	-	-
Toplam	7	7	8	7	7	8

GRAFİK 2: Modifiye Mankin Derecelendirme Sistemine Göre *Femur Medial*
Kondili Kıkırdak Dokusunun Değerlendirme Sonuçları

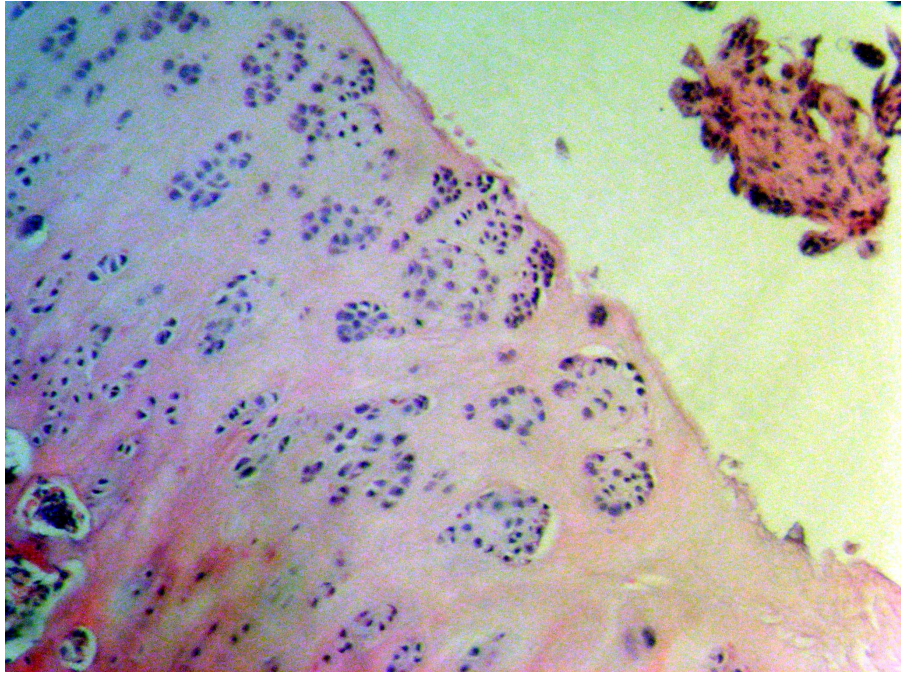


GRAFİK 3: Modifiye Mankin Derecelendirme Sistemine Göre *Tibia Medial*
Plato Kıkırdak Dokusunun Değerlendirme Sonuçları

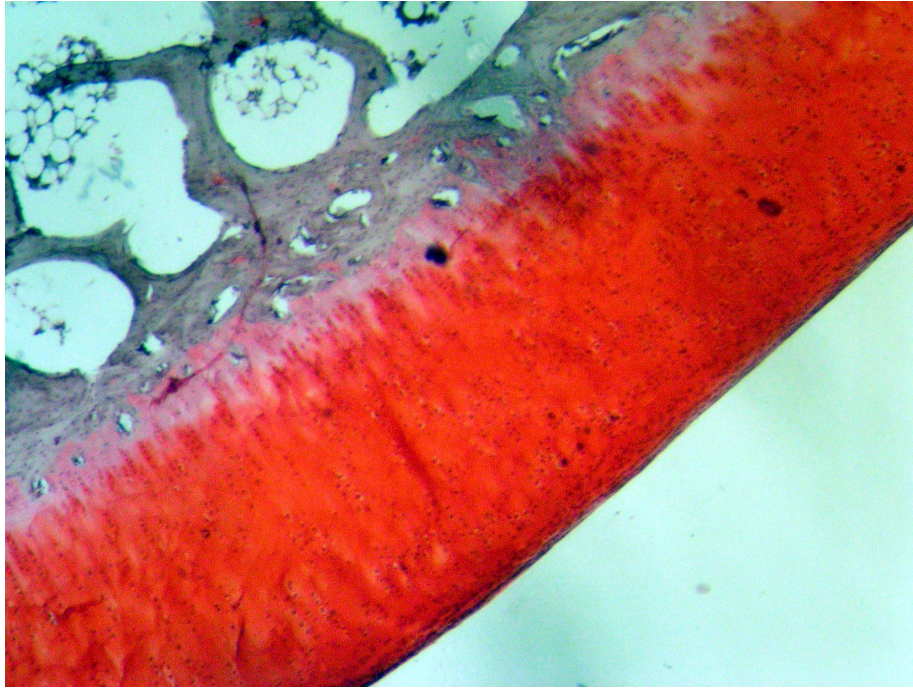




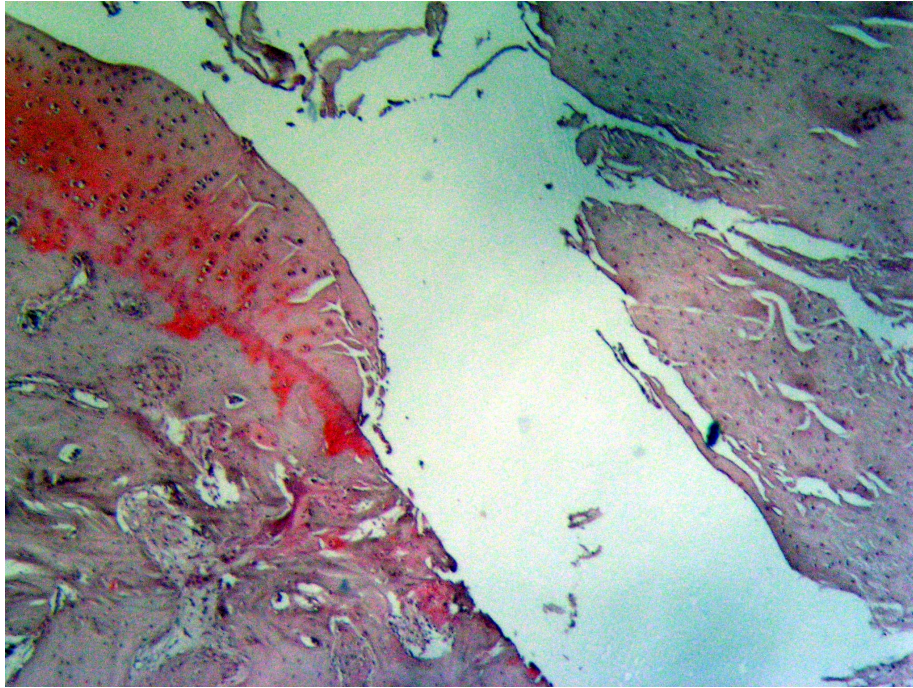
RESİM 1: Eklem yüzeyinde orta derecede yüzey düzensizliği (HEX200)



RESİM 2: Kondrositlerde belirgin klonlaşma (HEX100).



RESİM 3: Normal Safranin-O tutulumu



RESİM 4: Tam dezorganize görünümdeki eklem kıkırdağında belirgin olarak azalmış safranin-O tutulumu (Safranin-Ox100)

Sinovyal doku değişikliklerin histopatolojik değerlendirmesinde Yoshimi kriterlerine göre Grup I'deki puan ortalama $9,14 \pm 4,6$ (1-14), Grup II'de ortalama $3,83 \pm 3,4$ (0-9), Grup III'de ise ortalama $8,87 \pm 2,9$ (4-13) olarak tespit edildi (Tablo 8-9). Gruplarda elde edilen puanlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında Grup II'nin hem Grup I hem de Grup III ile arasındaki fark anlamlı iken ($p < 0.05$) Grup I ile Grup III arasındaki fark anlamsızdı ($p > 0.05$) (Grafik 4).

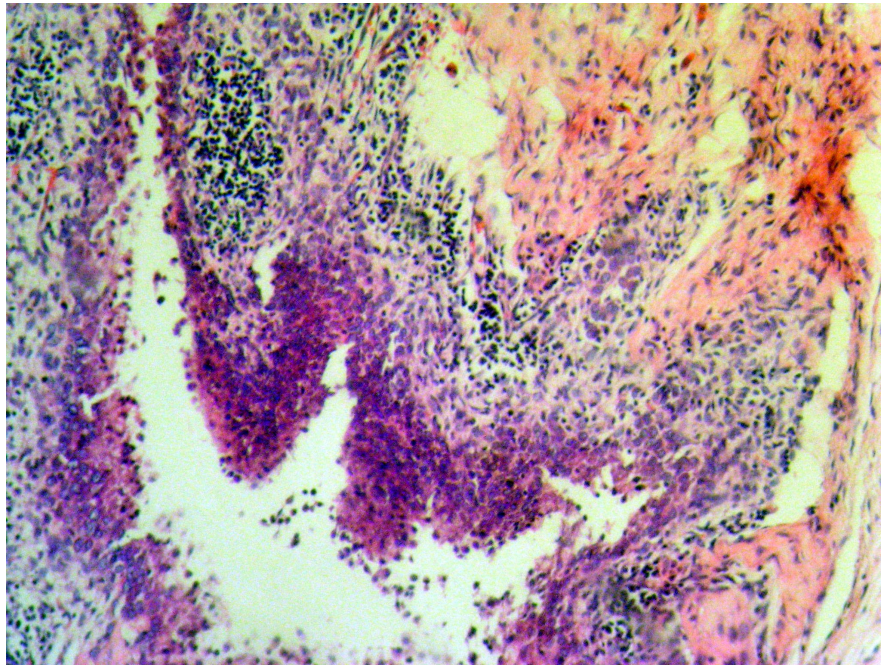
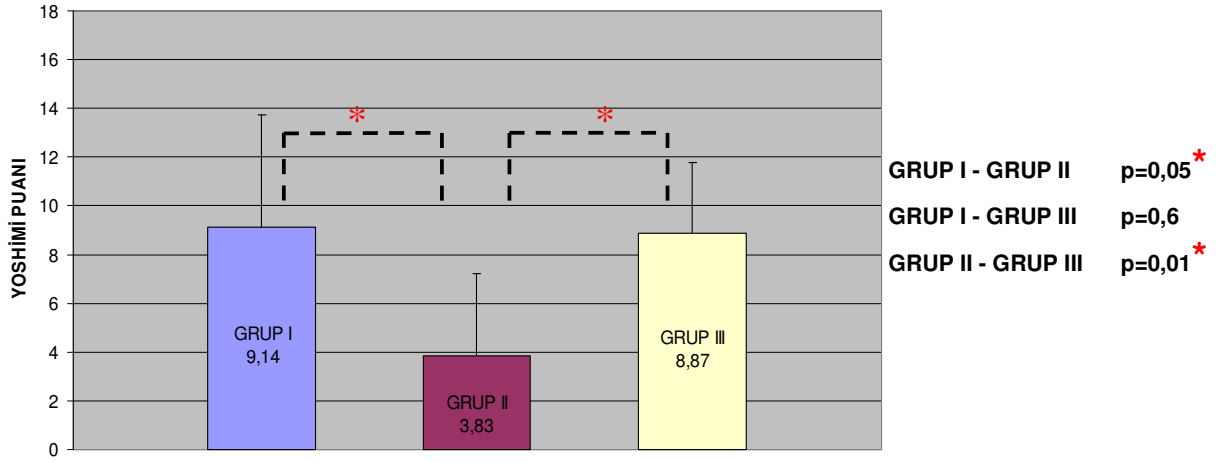
TABLO 8: Sinovyal Dokunun histopatolojik değerlendirme sonuçları (19)

	Grup I	Grup II	Grup III
Sinovyalı Döşeyen Hücre Tabakası			
I.Hiperplazi			
Normal	1	2	-
Hafif	1	3	2
Orta derecede	1	2	5
Ciddi	4	-	1
TOPLAM	7	7	8
II.Hipertrofi			
Normal	1	2	-
Hafif	1	3	2
Orta derecede	1	2	5
Ciddi	4	-	1
TOPLAM	7	7	8
III.inflamasyon			
Normal	2	5	1
Hafif	3	2	2
Orta derecede	2	-	4
Ciddi	-	-	1
TOPLAM	7	7	8
Subsinovyal Doku			
I.Granülasyon Dokusunun Proliferasyonu			
Normal	1	5	1
Hafif	3	1	6
Orta derecede	3	1	1
Ciddi	-	-	-
TOPLAM	7	7	8
II.Damarlanma			
Normal	-	2	-
Hafif	4	4	3
Orta derecede	3	1	4
Ciddi	-	-	1
TOPLAM	7	7	8
III.inflamasyon			
Normal	2	6	3
Hafif	2	1	4
Orta derecede	3	-	1
Ciddi	-	-	-
TOPLAM	7	7	8

TABLO 9: Sinovyal Dokunun histopatolojik değerlendirme sonuçları (19)

Sinovyadaki değişiklikler	Grup I	Grup II	Grup III
ortalama puan	9,14 (1-14)	3,83 (0-9)	8,87 (4-13)

GRAFİK 4: Sinovyal Dokunun histopatolojik değerlendirme sonuçları (19)



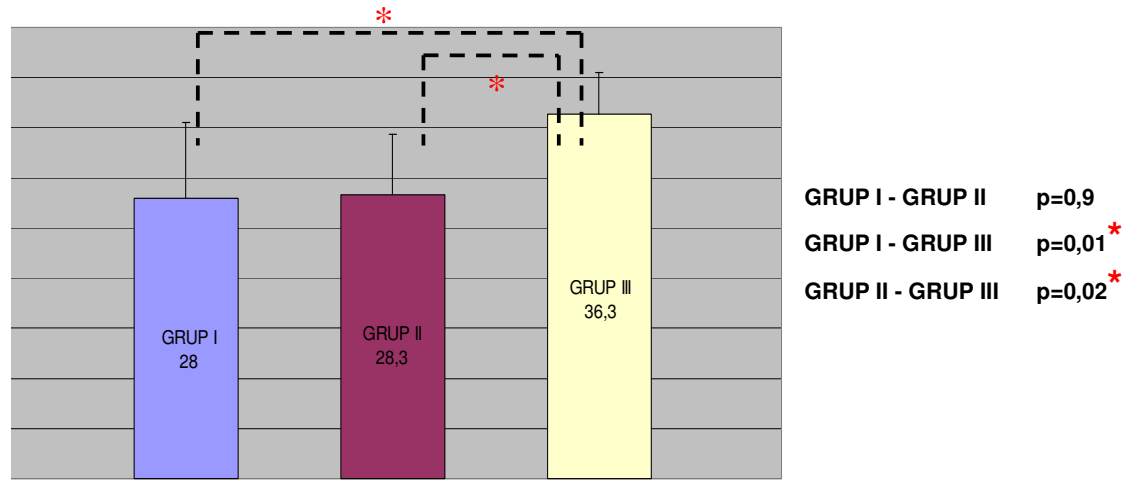
RESİM 5: Sinoviyayı döşeyen hücrelerde belirgin hiperplazi ve hipertrofi ile inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu (HEx200).

Sinovyal hücre tabakasının kalınlığı Grup I de ortalama $28 \pm 7,5 \mu\text{m}$ (15-38), Grup II de ortalama $28,3 \pm 6,0 \mu\text{m}$ (20-35), Grup III te ise ortalama $36,3 \pm 4,2 \mu\text{m}$ (30-40) olarak ölçüldü (Tablo 10). Sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; Grup I ile Grup II arasındaki farkın anlamsız ($p > 0,05$), Grup I ile III ve Grup II ile III arasındaki farkın ise anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0,05$) (Grafik 5).

TABLO 10: Sinovyalı Döşeyen Hücre Tabakasının Ortalama Kalınlığı

	Grup I	Grup II	Grup III
Sinovyalı döşeyen hücre tabakasının kalınlığı (μm)	28(15-38)	28,3(20-35)	36,3(30-40)

GRAFİK 5: Sinovyalı Döşeyen Hücre Tabakasının Ortalama Kalınlığı

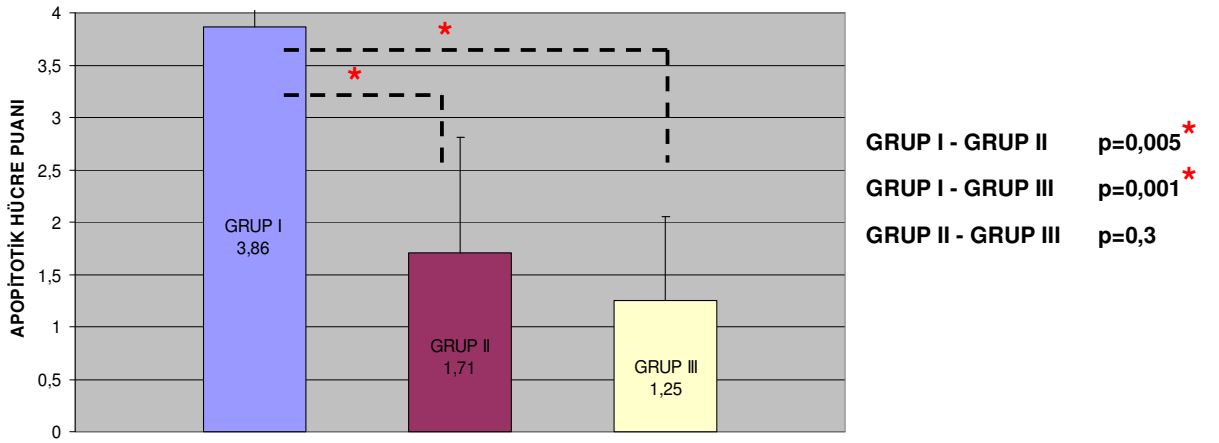


Apoptozun değerlendirilmesinde kullanılan caspase-3 boyaması ile yapılan immünohistokimyasal incelemede femur yüzeyel ve derin tabakası için ortalama değerler sırasıyla Grup I'de $3,86 \pm 0,3$ (3-4), $2,14 \pm 1,2$ (0-4), Grup II'de $1,71 \pm 1,1$ (0-4) , $0,57 \pm 1,1$ (0-1), Grup III'de ise $1,25 \pm 0,8$ (0-3) ve $0,13 \pm 0,3$ (0-1) olarak tespit edildi. Tibia yüzeyel ve derin tabakası için ise değerler sırasıyla Grup I'de $2,43 \pm 1,5$ (1-4) ve $1 \pm 1,5$ (0-3), Grup II'de $1,14 \pm 1,3$ (0-4) ve $0,43 \pm 1,1$ (0-3) ve Grup III'de $0,63 \pm 0,5$ (0-1) ve 0 olarak bulundu (Tablo 11). Değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında tibia derin tabakadaki caspase-3 boyanmasındaki fark üç grup arasında anlamsız iken ($p > 0,05$), femur yüzeyel ve derin tabakada Grup II ve Grup III'ün Grup I'e göre anlamlı oranla daha az oranda apoptotik hücre içerdiği ($p < 0,05$) ancak Grup II ve Grup III'ün kendi aralarında anlamlı fark olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$). Tibia yüzeyel tabakada ise sadece Grup I ve Grup III arasındaki fark anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (Grafik 6-9).

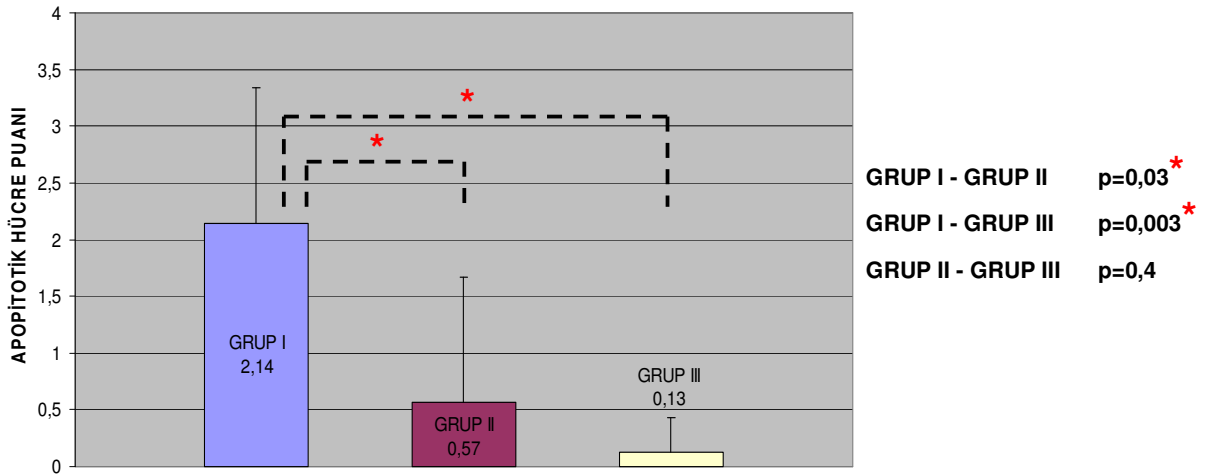
TABLO 11: Caspase-3 Boyası İle Boyanan Femur ve Tibia Kıkırdağının Yüzeyel ve Derin Tabakasındaki Apoptotik Hücre Sayımı Ortalama Puanı

GRUP	FEMUR		TİBİA	
	YÜZEYEL	DERİN	YÜZEYEL	DERİN
I	3,86 (3-4)	2,14 (0-4)	2,43 (1-4)	1 (0-3)
II	1,71 (0-4)	0,57 (0-1)	1,14 (0-4)	0,43 (0-3)
III	1,25 (0-3)	0,13 (0-1)	0,63 (0-1)	0 (0)

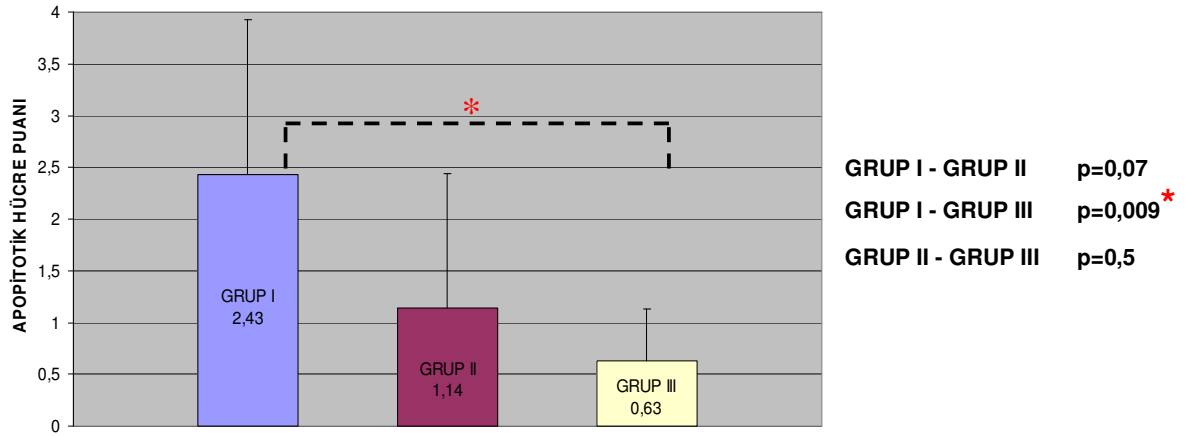
GRAFİK 6: Femur Yüzeyel Kıkırdak Tabakası Aktif Caspase 3 Boyaması Sonuçları



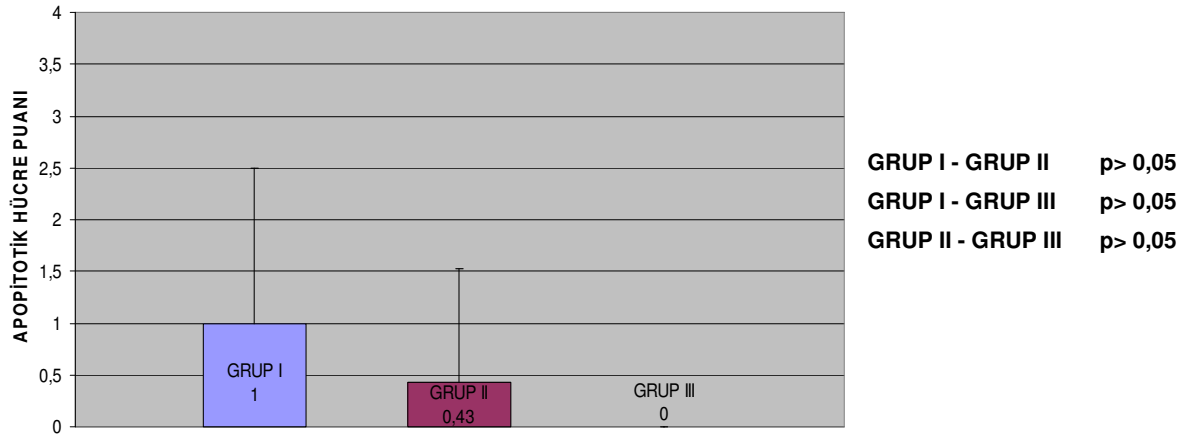
GRAFİK 7: Femur Derin Kıkırdak Tabakası Aktif Caspase 3 Boyaması Sonuçları

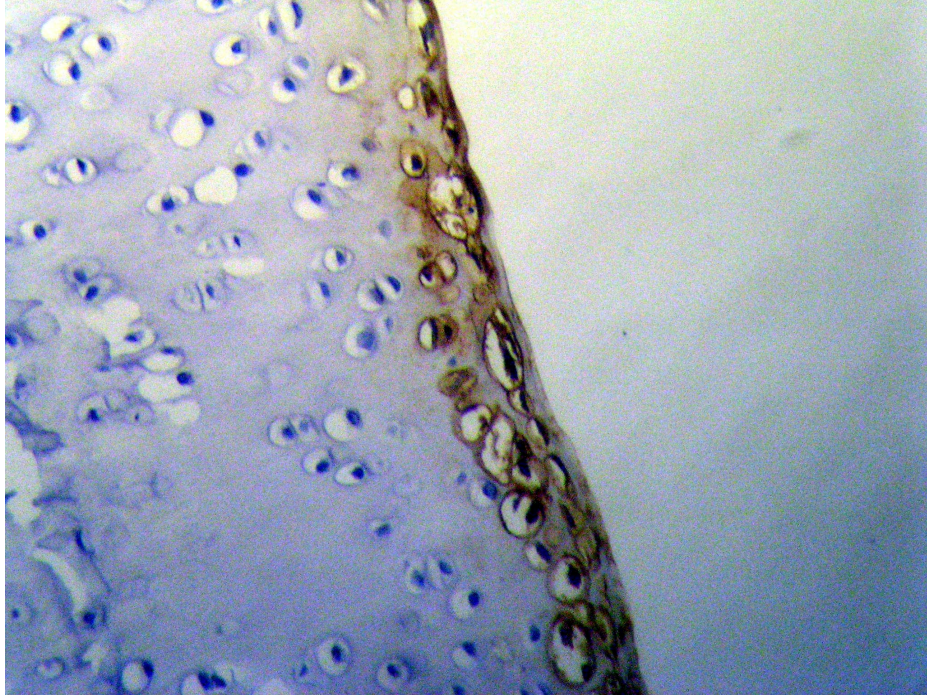


GRAFİK 8: Tibia Yüzeyel Kıkırdak Tabakası Aktif Caspase 3 Boyaması Sonuçları

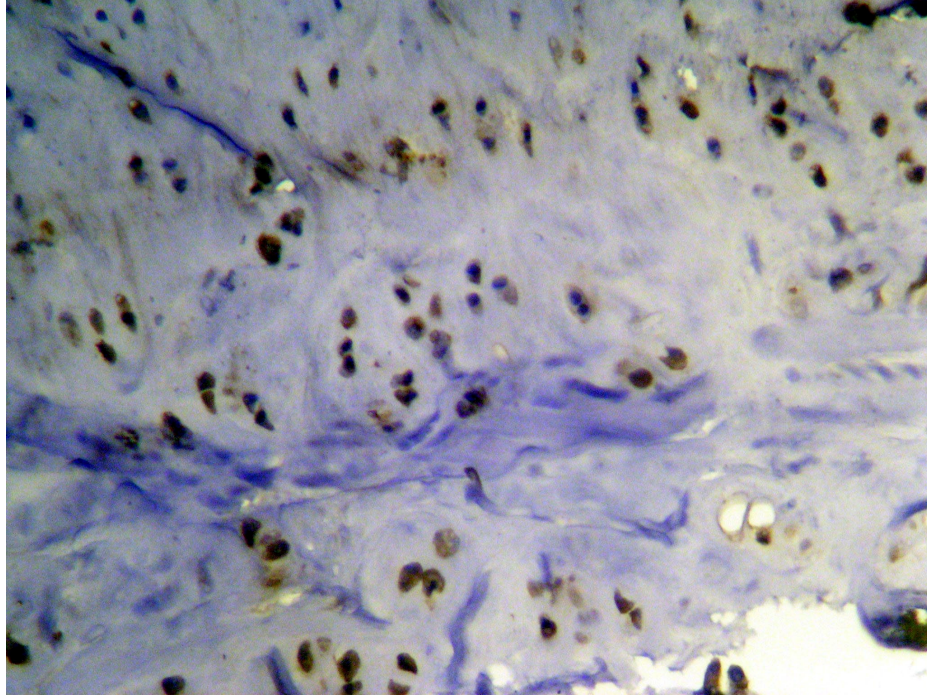


GRAFİK 9: Tibia Derin Kıkırdak Tabakası Aktif Caspase 3 Boyaması Sonuçları





RESİM 6: Yüzeyel tabakadaki kondrositlerde Caspase-3 ile 3. derece boyanma (Caspase-3x100).



RESİM 7: Derin tabakadaki kondrositlerde Caspase-3 ile 3. derece boyanma (Caspase-3x200).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Diatrodial eklemleri etkileyen ve progresif seyirli kronik bir hastalık olan OA, orta-ileri yaş popülasyonda en sık eklem ağrısı ve fonksiyonel kayıp nedenidir (44). Tek ya da aynı anda birden fazla eklemi ilgilendiren bu hastalıkta çoğunlukla ayak bileği, diz, kalça, omurga ve el eklemleri tutulmaktadır. Eklem kıkırdağına ek olarak sinovyal doku, bağlar, kapsül, kas, subkondral ve metafizial kemikte de patolojik değişikliklerin görüldüğü bu hastalığın tedavisinde amaç; ağrı ve fonksiyonel kaybı gidermektir. Tedavisinde konservatif ve cerrahi birçok farklı metodun uygulandığı bu olgularda kıkırdak hasarını engellemek ya da ilerlemesini yavaşlatmak hedeflenir. İleri evre kıkırdak hasarı olan OA' li olguların cerrahi tedavisinde günümüzde sıkça uygulanan ve başarılı orta-uzun dönem izlem sonuçları olan Total Eklem Protezlerinin, gelecek 20 yılda uygulama sıklığında %600'lere varan oranlarda artış öngörülmesine karşın, izlemlerde gelişebilecek sorunlar, bu sorunların çözümündeki güçlükler ve yüksek maliyet, araştırmacıları bu uygulamaların gereksinimini azaltabilecek yöntemlerin geliştirilmesine yöneltmiştir (46). Kıkırdak dejenerasyonun önlenmesi yada giderilmesinde kullanılacak yöntemlerin geliştirilmesi amacıyla 250 yıldır süren araştırmalar, son 3 dekatta ivme kazanmıştır (45). Farklı birçok deneysel çalışmada büyüme faktörleri, perikondrium, periost, mezenkimal kök hücre, birçok mediatörler ve HA'in kıkırdak üzerindeki koruyucu etkileri araştırılmıştır (45-50,86,92). Deneysel çalışmalarda elde edilen başarılı sonuçlar, bu yöntemlerden bir kısmının klinik uygulamalarda da kullanılmasını sağlamıştır. İlk kez Peyron ve Balazs (51) tarafından 1974 yılında dejeneratif artritli hastalarda uygulanan eklem içi HA'in başarılı klinik sonuçları, farklı birçok çalışmada da gösterilmiş ancak alerjik reaksiyon, lokal enflamasyon, ağrı gibi %13'lere varan oranlarda bildirilen yan etkiler, araştırmacıları gerek yan etkisi daha az gerekse de kondroprotektif etkinliği daha yüksek yeni ajanların geliştirilmesine yöneltmiştir. Hyalüronik asite ek olarak kıkırdak metabolizmasında etkili insulin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve fibroblast

büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme hormonlarını, fibronektin, laminin ve vitronektin gibi hücrelerarası matriksin önemli glikoproteinlerini, insan fibroblast kollajenaz inhibitörü benzeri bir glikoproteini, α 2- makroglobulini ve doku metalloproteinaz inhibitörlerini de (TIMP) içeren ve inert bir sıvı olan İAS'ın kondroprotektif etkinliğini değerlendiren çalışmalar literatürde kısıtlı olup, bu çalışmaların hiçbirinde HA gibi kıkırdak koruyucu etkinliği bilinen bir ajan ile etki gücü karşılaştırılmamıştır (40,93). Çalışmamızda tavşanlarda oluşturulan deneysel OA modelinde eklem içi uygulanan İAS'nin kondroprotektif etkinliğinin varlığı serum fizyolojik uygulanan kontrol grubuyla (plasebo), etki gücü de kondroprotektif etkinliği bilinen HA uygulanan grup (pozitif kontrol) ile yarı kantitatif ve kantitatif yöntemlerle karşılaştırılması amaçlandı.

Yavaş seyirli bir hastalık olan OA'in gelişimi, ilerlemesi ve tedavisiyle ilgili deneysel araştırmaları insanlarda yapmanın etik olmaması ve kıkırdak dejenerasyon sürecinin uzun olması nedeniyle çeşitli deneysel modeller geliştirilmiştir (52-55,91). Uygun deneysel OA modeli; ekonomik, uygulaması kolay, tekrarlanabilir, mekanizma ve histopatolojik değişiklikler açısından insanlarda gelişen OA'e benzer özellikte olmalıdır. At, köpek, rat ve tavşan gibi farklı birçok deney hayvanının kullanıldığı bu modellerde OA geliştirmek amacıyla immobilizasyon, menisektomi, ekstremite denervasyonu, kimyasal ajanlar ve eklemi instabil hale getiren yöntemler uygulanmıştır (7,11,13,23,52,53,82,90,91). Evans ve ark. (54) rat dizlerinde immobilizasyon uygulayarak oluşturdukları modelin insan OA'indeki süreç ile benzer olduğunu belirtirken Yoshioka ve ark. (41) ise bu modelde kıkırdak onarım özelliklerinin insandaki spontan OA'ten farklı olabileceğini, ayrıca parsiyel medial menisektomi yöntemi ile geliştirilen osteoartritik lezyonların da çok yavaş progresyonlu olduğunu belirtmişlerdir. Hulth ve ark. (55) bu süreci hızlandırmak amacıyla total medial menisektomi ile birlikte iç yan bağ ve her iki çapraz bağı keserek oluşturdukları modelde, uygulanan cerrahi işlem sonrası gelişen yoğun inflamasyonun, eklem çevresinde fibrozise ve buna bağlı hareket kısıtlılığına neden olarak, dejeneratif değişikliklerin ortaya çıkmasına engel olduğunu bildirmişlerdir. Eklem stabilizasyonunu azaltarak biyomekanik yüklenmeleri değiştiren ön çapraz bağ kesilmesi yöntemi ise uygulaması kolay, komplikasyonu az olup insandakine benzer özellikte

osteoartritik değişiklikler geliştirmesi nedeniyle farklı birçok deneysel çalışmada tercih edilen yöntem olmuştur (11,52,68,79).

Deneysel OA modellerinde kullanılacak hayvan türünün de çalışma sonuçlarını değerlendirmede etkili olabileceği belirtilmektedir (19,52). İdeal deney hayvanı, biyomekanik olarak insan eklemi ile benzer özellikler taşıyan, OA oluşturmak amacıyla yapılacak cerrahinin kolayca uygulanabileceği, değerlendirme için yeterli doku teminine olanak veren, ucuz ve bakımı kolay olarak tanımlanabilir. Pond ve Nuki (56), köpeklerde B'ı keserek oluşturdukları OA modelinde, gelişen dejeneratif değişikliklerin insandakine benzer özellikte olduğunu göstermelerine karşın, köpeklerin cerrahi uygulanmış ekstremitelere yüklenmeden hareket edebilme yeteneği taşıması ve maliyetinin yüksek olması nedeniyle çalışmalarda daha az kullanılmaktadır (19). İnsan dizi ile benzer yapısal özellikler gösteren ve cerrahi uygulanmış ekstremitesini de hareket sırasında kullanan tavşanda ise n çapraz bağ kesilmesi sonrası kıkırdak dokuda gelişen erken dönem değişikliklerin yavaş seyretmesi ve morfolojik özelliklerinin insandaki OA ile uyum göstermesi, bu modelin deneysel çalışmalarda sıkça tercih edilmesine neden olmaktadır. Ayrıca tavşan dizlerinde kk bir insizyondan medial meniskse zarar vermeden B'in kesilebilmesi, ameliyat sonrası kanama ve sinovitin az olması ve kıkırdak dejenerasyonunun kademeli olarak gelişmesi, bu modelin ek avantajları olup uygulanan ajanların terapötik etkinliğini değerlendirmede seçilebilir bir yöntem olduğu belirtilmektedir (19,57). İnsan Amniyotik Sıvısı ve HA'in kıkırdak ve sinovyal doku üzerindeki etkilerinin karşılaştırıldığı bu çalışmada deneysel OA oluşturmak amacıyla tavşanlarda B'in kesildiği model kullanıldı.

Erken dönem OA'te görülen hücre dansitesinde azalma, yüzeyel kıkırdak tabakasında bozulma yada lokalize fibrilasyonun gelişmesi için deneysel modellerde farklı sreler kullanılmıştır(41,52,79,80). Tavşan diz ekleminde B kesilmesi sonrası erken dönem osteoartritik lezyonların gelişmesi için gereken bu sürenin genellikle 6-8 hafta olduğu belirtilmektedir (58). Yoshioka ve ark.nın (41) 30 tavşanı 3 gruba ayırdıkları ve B kesimi sonrası osteoartritik değişiklikleri 4,8,12. haftalarda değerlendirdikleri çalışmalarında,

erken dönem değişikliklerin 4. haftada başladığını ancak hiçbir deney hayvanında tam kat tutulum olmadığını, 8-12. haftalarda ise tavşanların % 50 sinde tam kat tutulumun görüldüğünü tespit etmişlerdir. Papaioannou ve ark (52) ise aynı modeli kullanarak yaptıkları çalışmalarında erken dönem değişikliklerin ilk 8 haftada hızla geliştiğini, 16. haftadaki değerlendirmelerinde ise onarım sürecine bağlı olarak progresyonun yavaşladığını, 8-16. haftalarda makroskobik ve eklem kıkırdak morfolojisinin mikroskobik değerlendirme sonuçları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğunu bildirmişlerdir.

Ön çapraz bağ kesilmesi sonrası instabil hale gelen tavşan dizlerinde erken dönem dejeneratif değişikliklerin öncelikle medial kompartmanda başladığı belirtilmektedir (94,95). Setton ve ark (94) deneysel osteoartrit oluşturmak amacıyla aynı modeli kullandıkları tavşan dizlerinde femur medial kondilinin laterale göre osteoartritik değişikliklerden daha fazla etkilendiğini, Chang ve ark. (95) ise tibia platosunda meniskal doku dışında kalan alanlarda hafif ve orta derecede dejeneratif değişikliklerin meydana geldiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda ÖÇB kesilmesini takiben 1. haftadan itibaren 1'er hafta arayla 3 doz intraartiküler enjeksiyon uygulayıp 8 hafta sonra sakrifiye edilen tavşan dizlerinde gelişen erken dönem osteoartritik değişiklikler medial femoral kondil ve medial tibial platoda incelendi.

Deneysel OA modellerinde gelişen dejeneratif değişikliklerin histopatolojik incelemesinde kullanılan Mankin, Wakatani, Pineda, Yoshimi, Sellers, Mendelson ve bunların modifikasyonları, ışık mikroskobu ile yapılan yarı-kantitatif değerlendirme yöntemleri olup değerlendirene bağlı olarak subjektif hatalara yol açabilir (19,20,43,59-61). Bu hataları en aza indirmek amacıyla kıkırdak ve sinovyal dokuların değerlendirilmesinde histomorfometrik, immünohistokimyasal ve spektrofotometrik birçok kantitatif yöntemlerin de kullanılması önerilmektedir (62-64). Maliyeti artıran ve ek donanımları gerektiren bu metodlar son yıllardaki deneysel OA ile ilgili çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır (65). Pritzker ve ark. (66), osteoartritik kıkırdak histopatolojisinin evreleme ve derecelendirmesinde kullanılacak olan ideal evreleme sisteminin basit, ölçülebilir, tekrarlanabilir ve karşılaştırılabilir

özellikler içermesi gerektiğini belirtmişlerdir. Yarı-kantitatif metodlar içerisinde en sık kullanılan Mankin evreleme sistemi ve modifikasyonlarında doğruluk ve tekrarlanabilirliğin tartışmalı olduğunu belirten araştırmacılar olmasına karşın, bu evreleme sistemi ile birlikte kantitatif yöntemlerin kullanıldığı çalışmalarda sonuçlar genellikle birbirine paralellik göstermektedir. Ostergaard ve ark (67) 13'ü normal, 21'i osteoartritlik olan insan diz eklemlerinden toplam 89 histolojik kesit olarak yaptıkları değerlendirmede kıkırdak hasarının hafif ve orta şiddette olduğu alanlardan yapılan histopatolojik değerlendirmede, Mankin derecelendirme sisteminin hastalığın erken dönemlerini ayırt edebilmede yetersiz kaldığını tespit etmişlerdir. Hongbin ve ark. (68) 20 tavşanda ÖÇB kesilmesi ile meydana getirdikleri deneysel OA modelinde sonuçları değerlendirmek için Mankin evreleme sistemi ve immünohistomorfometrik yöntemi, Matsuo ve ark. (69) ise artroplasti uygulamaları sırasında elde edilen insan osteoartritlik kıkırdak dokularında Mankin evreleme sistemi ile 4 farklı kantitatif immunohistokimyasal yöntemi kullanmışlar ve sonuçlarının benzer olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda kullanımı kolay ve daha önce farklı birçok çalışmada kullanıldığı için bulguların karşılaştırılabilmesine olanak sağlayan yarı-kantitatif modifiye Mankin değerlendirme sistemine ek olarak kantitatif bir yöntem olan ve apoptotik kondrositleri değerlendiren immünohistokimyasal yöntem de kullanarak olası subjektif hataların azaltılması amaçlandı.

Etyopatogenezinde farklı birçok etkenin rol oynadığı OA'te kıkırdağın şok absorbe edici etkisinin azalması ya da kaybolması klinik semptomların ortaya çıkışına neden olmaktadır. Kıkırdağın kompresif yüklenmelere karşı koyabilme gücü matriksin yapısından kaynaklanmaktadır. Kondrositler tarafından sentez edilen ve yapım ile yıkımın dengede olduğu hücrelerarası matriksin bileşenlerinde kayıp, eklemdede dejenerasyonla sonuçlanır. Osteoartritin patogenezinde matriks yıkımına neden olan katabolik etkili birçok enzim araştırılmış olmasına karşın, matriks bileşenlerin sentezinden sorumlu olan kondrositlerdeki azalmanın etkisi son yıllarda daha dikkati çeker olmuştur (64). Temel görevi matriks yapımı ile yıkımı arasındaki dengenin korunması olan kondrositlerde meydana gelen ölümün, kıkırdak harabiyeti gelişmesinde etkili olduğu ve önceleri nekroz olarak kabul edilen kondrosit ölüm mekanizmasının da günümüzde apoptoz ile ilişkili olduğunu belirtilmektedir (3-7).

Programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü veya hücre intiharı olarak da belirtilen apoptoz terimi, ilk olarak 1972 yılında Kerr ve ark (70) tarafından kullanılmış ve canlı dokudaki hücre azalmasından sorumlu olan özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır. Doku homeostazının korunmasında kritik öneme sahip olan apoptoz, organizma tarafından düzenlenen enerji bağımlı hücre ölümü olup klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozdan birçok özelliği ile farklı olduğu belirtilmiştir (9).

Çok sayıda mediatör tarafından düzenlenen apoptozda hücrenin yaşayabilirlik durumunu pro-apoptotik ve anti-apoptotik ajanların oranına bağlıdır. Mitokondri iç membranında bulunan ve elektron transport zincirinin bir proteini olan sitokrom C, apoptozis-indükleyici faktör ile birlikte sitoplazmaya salınır ve sitoplazmik protein olan Apaf-1'e (Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1) bağlanarak aktive eder. ATP'nin de katılımıyla inaktif olan prokaspaz-9 aktif kaspaz-9'a dönüşür ve efektör kaspaz olan kaspaz 3 aktifleşir. Kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbestleşir ve apoptozun karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu gelişir (3,4,9,87).

Kaspaz'lar (caspase), zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskada neden olan 14 ayrı kaspaz tanımlanmış olup çoğu apoptoz gelişiminde rol almaktadır. Kaspaz 2, 8, 9, 10 gibi "başlatıcı kaspazlar" apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini Kaspaz 3, 6, 7 gibi "efektör kaspazlara" iletirler (9,11,12).

Osteoartrit patogenezindeki etkin rolü ortaya konan apoptozun bu hastalığın değerlendirilmesinde belirteç olarak ta kullanılabileceği fikrini düşündürmüştür. Morfolojik, biyokimyasal, immunolojik, immunohistokimyasal ve moleküler biyoloji gibi farklı yöntemler kullanılarak tespit edilebilen apoptozda en sık kullanılan metotların TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labelling) ve caspase-3 boyaları olduğu ancak TUNEL metodunda teknik hataların sıkça

görüldüğü ve apoptoz ile nekroz arasındaki ayırımın tam olarak yapılamadığı belirtilmektedir (3,8). Matsuo ve ark. (69) OA yada femur boyun kırığı nedeniyle Total Kalça Artroplastisi uyguladıkları 12 olgudan hazırladıkları 18 histolojik kesite kırıldak dejenerasyonu ile caspase-3 boyanmasının korele olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda apoptotik kondrositlerin tespiti amacıyla caspase-3 boyası kullanıldı.

Osteoartrit patogeneğinde kırıldak hücreleri üzerine katabolik etkiye sahip olan IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-11, IL-17, IL-18 gibi proinflatuar sitokinlerin, kollojenaz, stromelisin, gelastinaz gibi MMP'ların, prostoglandinlerin ve NO'nun arttığı, IL-4, IL-10, IL-13 gibi antiinflatuar sitokinlerin, TIMP ve IGF-I, TGF, bFGF, BMP gibi büyüme faktörlerinin azaldığı gösterilmiştir (1,88). Kırıldak dokuda yıkıma neden olan bu mediatörlerin etkilerini önleyebilecek, proteolitik enzimleri baskılayabilecek veya matriks sentezini artıracak terapotik ajanların geliştirilmesi OA tedavisinde araştırma konularını oluşturmaktadır. Farklı birçok deneysel çalışmada HA, caspase inhibitörleri, NO inhibitörleri, TNF-alfa inhibitörlerinin intraartiküler uygulaması ve kondritin sulfat, fursultiamine, doksisisiklin gibi ajanların oral kullanılmasının kondroprotektif etkileri araştırılmıştır (71-74,89). Kırık, tendon ve periferik sinir iyileşmesine ve kırıldak rejenerasyonuna etkileri farklı birçok çalışmada değerlendirilen İAS'ın ise kırıldak ve sinovyal doku üzerindeki etkileri az sayıda çalışmada incelenmiştir (40,93). İnsan amniotik sıvısı, kırıldak sentezini etkileyen insulin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme hormonları, fibronektin, laminin ve vitronektin gibi hücrelerarası matriksin önemli glikoproteinleri, HA ve HA aktive edici ajan (HASA) gibi makromolekülleri ile kırıldak yıkımını önleyebilecek faktörlerden; insan fibroblast kollajenaz inhibitörü benzeri bir glikoprotein, α 2- makroglobulin ve doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP) içeren zengin bir kompozit olup içerdiği faktörlerin konsantrasyonları gebelik süresince değişir (24-34). İkinci trimester gebelerden alınan İAS'ta yapılan proteomik analizde, Cho J. ve ark. (75) 842 farklı protein olduğunu, Tsangaris G. ve ark.da (76) 174 ayrı enzim ve enzim subuniti, 75 yapısal, 41 transport, 34 sinyal iletilici ve 38 farklı koruyucu proteini içerdiğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda, kondroprotektif etkinliği değerlendirilen İAS, 2.trimester

gebelerden elde edilmiş olup hücrelerinden arındırıldıktan sonra intraartiküler olarak uygulanmıştır.

Osteoartrit tedavisinde güncel yaklaşım olan kıkırdak koruyucu ajanların etki gücü ve mekanizması ile ilgili farklı görüşler ileri sürülmüştür. Üzerinde en çok araştırma yapılan ajanlardan biri olan ve kondroprotektif etkisi klinik çalışmalarla da doğrulanan HA'in kıkırdak dokuda proteoglikan (PG), keratan sulfat ve kondroitini de içeren kıkırdak matriksinin sentezini ve kollojen gen ekspresyonunu artırdığı, PG yıkımını ise azalttığı gösterilmiştir (16,21,23,77). Hyalüronik asit bu etkisini, kıkırdak dokuya penetre olarak PG sentezini suprese eden ve MMP seviyesini artıran fibronektin fragmanlarını ve bu fragmanı geliştiren Stromelisin-1'in salınımını engelleyerek yaptığı ayrıca proinflamatuvar sitokinler olarak bilinen TNF- α ve IL-1 β 'yi, kondrosit apoptozisinde etkin olan NO salınımını azalttığı, MMP inhibitör seviyelerini ise artırdığı bildirilmiştir (78,92). Diaz-Galleo ve ark. (22) tavşan deneysel osteoartrit modelinde ÖÇB kesilmesi sonrası 5. ve 10. haftalarda başlayarak haftada bir kez olmak üzere 5 hafta süre ile uyguladıkları intraartiküler HA'in kıkırdak dokudaki apoptozu anlamlı oranda azalttığını, sonuçların OA'in erken dönemlerinde daha başarılı olduğunu tespit etmişlerdir. Şen ve ark. (79) da ÖÇB'ı kestikten 1 hafta sonra haftada bir kez olmak üzere üç doz olarak uyguladıkları intraartiküler HA'in tavşan kıkırdak dokusu üzerindeki etkilerini Mankin kriterlerine göre değerlendirmişler ve HA'in erken evrede OA gelişimini yavaşlattığını bildirmişlerdir. Hyalüronik asitin sinovyal doku üzerindeki etkilerini değerlendiren bir çalışmada Tkahashi ve ark (16), intraartiküler uygulanan HA'in kontrol grubuna göre sinovyal dokuda MMP-3 ve IL-1 β seviyelerini anlamlı oranda azalttığını tespit etmişlerdir.

Normal eklemden bulunan HA'e göre daha konsantre halde üretilen bu ajanın molekül ağırlığı da farklı olup bunun kondroprotektif etki gücünü değiştirebileceği belirtilmektedir (96). Shimizu ve ark. (80) 132 tavşanın ÖÇB'ını keserek, 4. haftadan itibaren 5 hafta süre ile intraartiküler olarak uyguladıkları 4 farklı molekül ağırlığına sahip HA preparatının etkilerini histomorfometrik ve biyokimyasal yöntemlerle karşılaştırdıkları çalışmalarında, 800 kd molekül ağırlığına sahip preparatın en yüksek kondroprotektif etkinliğe

sahip olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda İAS ile kondroprotektif etki gücünü karşılaştırdığımız HA uygulamasında bu molekül ağırlığına en yakın olan Hyalgan® (700 kd) preparat kullanıldı.

Hyalüronik asite ek olarak birçok farklı büyüme faktörü, protein ve mediatörleri de içeren İAS'ın kıkırdak ve sinovyal doku üzerindeki etkilerinin hangi faktör ya da faktörlerle ilişkili olduğu kesin olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte içeriğinde bulunan TGF- β 'nin birçok hücre tipinin proliferasyon, diferansiyasyon, migrasyon ve apoptozunda etkili olduğu belirtilmektedir (50). Kıkırdak dokudan yapılan *invivo* ve *invitro* çalışmalarda bu faktörün proteoglikan ve kollojen tip II sentezini artırdığı, MMP-13, MMP-14, IL-1 ve TNF α gibi matriks ve kollojen yıkımına neden olan ajanları azalttığı ve TIMP seviyelerini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca genetik çalışmalarda OA semptomları ile TGF- β arasında ilişkinin olduğu ve intraartiküler uygulanan tek doz 200 ng TGF- β 'nin 3 hafta süre ile proteoglikan sentezini artırdığı bildirilmiştir (85). Kıkırdak dokuda anahtar anabolik ve diferansiyasyon faktörü olarak görev alan IGF'ün de proteoglikan dengesinde etkin rolü olduğu gösterilmiştir (84). Marvin ve ark (97) insan kültür kondrositlerinde caspase inhibitörü ve IGF'ün etkilerini karşılaştırdıkları deneysel çalışmalarında, IGF'ün apoptozu engellediğini, Nixon ve ark.(81) da IGF-1 gen terapisi uyguladıkları *invitro* çalışmalarında, sinovyal membranda HA üretiminin arttığını, OA'te eklem kıkırdağına yönelik IGF-1 gen terapisi uygulamasının tedavi yöntemi olabileceğini belirtmişlerdir. İntraartiküler uygulanan İAS'ın kıkırdak ve sinovyal doku üzerindeki etkilerini deneysel OA modelinde değerlendiren Tirelioğlu O. (40), modifiye Mankin derecelendirme sistemine göre kıkırdak dokunun değerlendirmesinde puanların femur medial kondil için ortalama 6.6 (1-12), tibia medial platosu için ortalama 7.0 (1-12), sinovyal dokunun histopatolojik değerlendirmesinde ise de puanın ortalama 6.3 (3-8) olduğunu belirterek kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık tespit etmiştir. Satoğlu ve ark (93) ise tavşan medial femoral kondillerinde yaptıkları tam kat kondral defektleri intraartiküler İAS uygulaması sonrası 4. ve 12. haftada değerlendirmişler ve modifiye O'Driscoll puanlama sistemine göre elde edilen sonuçların istatistiksel olarak anlamsız olduğunu belirtmişlerdir. İnsan amniotik sıvısının eklem kıkırdağı üzerindeki etkilerini inceleyen bu iki çalışmada da değerlendirme yarı kantitatif metodlar ile yapılmış ve

kondroprotektif etkisi bilinen bir ajan ile pozitif kontrol grubu oluşturulmamıştır. Çalışmamızda gerek HA gerekse de İAS'ın serum fizyolojik uygulanan kontrol grubuna göre kıkırdak ve sinovyal doku üzerinde olumlu etkileri olduğu görüldü. Bununla beraber HA uygulanan tavşanların kıkırdak dokusundaki dejeneratif değişikliklerin ve sinovyal dokudaki enflamasyonun diğer tavşanlardan daha az olması, laboratuvar ortamında üretilen bu ajanın yüksek konsantrasyon ve molekül ağırlığı ile ilişkili olabilir.

Bu çalışmada;

- 1- ÖÇB kesilmesi ile oluşturulan deneysel OA modelinin terapötik ajanların etkilerinin değerlendirilmesinde uygun bir yöntem olduğu
- 2- İAS ve serum fizyolojik (plasebo) uygulamalarının kıkırdak doku üzerine olan etkileri karşılaştırıldığında İAS'ın kondroprotektif etkinliğinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu
- 3- HA ve serum fizyolojik (plasebo) uygulamalarının kıkırdak doku üzerine olan etkileri karşılaştırıldığında HA'in kondroprotektif etkinliğinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu
- 4- İAS ve HA (pozitif kontrol) uygulamalarının kondroprotektif etkileri karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu
- 5- İAS ve HA (pozitif kontrol) uygulamalarının sinovyal doku üzerine olan etkilerinin histopatolojik olarak karşılaştırıldığında HA'in koruyucu etkinliğinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak; kondroprotektif etkisi HA ile karşılaştırılabilir düzeyde olan İAS'ın farklı kimyasal işlemlerden geçirilerek terapötik etkisinin artırılması ile OA tedavisinde güncel yaklaşımlarından biri olan kıkırdak koruyucu ajanlara alternatif bir yöntem olabileceği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

- 1- Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, Setton LA, Weinberg JB. The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2004 Jun;(423):17-26.
- 2- Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect.* 1998;47:477-86.
- 3- Sharif M, Whitehouse A, Sharman P, Perry M, Adams M. Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3. *Arthritis Rheum.* 2004 Feb;50(2):507-15.
- 4- Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum* 1998;41:284-9.
- 5- Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41: 1632-8.
- 6- Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1266-74.
- 7- Kim DY, Taylor HW, Moore RM, Paulsen DB, Cho DY. Articular chondrocyte apoptosis in equine osteoarthritis. *Vet J* 2003;166:52-7.
- 8- Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE, Sharif M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007 Jan;15(1):27-34.
- 9- Dr. Engin Ulukaya Apoptozis ders notları. UÜTF Biokimya AD.. 2003
- 10- Hirota Y, Habu M, Tominaga K, Sukedai M, Matsukawa A, Nishihara T, Fukuda J. Relationship between TNF-alpha and TUNEL-positive chondrocytes in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med.* 2006 Feb;35(2):91-8.
- 11- D'Lima D, Hermida J, Hashimoto S, Colwell C, Lotz M. Caspase inhibitors reduce severity of cartilage lesions in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2006 Jun;54(6):1814-21
- 12- Lee D, Long SA, Adams JL: Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7 inhibit apoptosis and maintain cell functionality. *J Biol Chem* 2000 271, 16007-16014
- 13- Galois L, Etienne S, Grossin L, Watrin-Pinzano A, Cournil-Henrionnet C, Loeuille D, Netter P, Mainard D, Gillet P. Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004 Oct;12(10):779-86.
- 14- D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Lotz MK, Colwell CW Jr. Prevention of chondrocyte apoptosis. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A Suppl 2
- 15- Costouros JG, Kim HT. Preventing chondrocyte programmed cell death caused by iatrogenic injury. *Knee.* 2007 Mar;14(2):107-11
- 16- Takahashi K, Hashimoto S, Kubo T. Hyaluronan suppressed nitric oxide production in the meniscus and synovium of rabbit osteoarthritis model *Journal of Orth. Res.* 2001, 19, 500-3
- 17- Amiel D, Toyoguchi T, Kobayashi K, Bowden K. Long-term effect of sodium hyaluronate (Hyalgan®) on osteoarthritis progression in a rabbit model *OsteoArthritis and Cartilage* 2003 11, 636–643
- 18- Hulmes DJ, Marsden ME, Strachan RK, Harvey RE, McInnes N, Gardner DL. Intra-articular hyaluronate in experimental rabbit osteoarthritis can

- prevent changes in cartilage proteoglycan content. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004 Mar;12(3):232-8.
- 19-Yoshimi T, Kikuchi T, Obara T, Yamaguchi T, Sakakibara Y, Itoh H, Iwata H, Miura T. Effects of high-molecular-weight sodium hyaluronate on experimental osteoarthritis induced by the resection of rabbit anterior cruciate ligament. *Clin Orthop Res*. 298: 296-304, 1994.
 - 20-Mendelson S, Wooley P, Lucas D, Markel D. The effect of hyaluronic acid on a rabbit model of full-thickness cartilage repair. *Clin Orthop Res*. 424: 266-271, 2004.
 - 21-Kobayashi K, Amiel M, Harwood FL, Haley RM, Sonoda M, Moriya H, Amiel D. Long-term effects of hyaluronan during development of osteoarthritis following partial meniscectomy in a rabbit model. *Osteoarthritis Cart*. 8:359-365, 2000
 - 22-Díaz-Gallego L, Prieto JG, Coronel P, Gamazo LE, Gimeno M, Alvarez AI. Apoptosis and nitric oxide in an experimental model of osteoarthritis in rabbit after hyaluronic acid treatment. *J Orthop Res*. 2005 Nov;23(6):1370-6.
 - 23-Echigo R, Mochizuki M, Nishimura R, Sasaki N. Suppressive effect of hyaluronan on chondrocyte apoptosis in experimentally induced acute osteoarthritis in dogs. *J Vet Med Sci*. 2006 Aug;68(8):899-902.
 - 24-Harris MJ, Mennuti MT et al. Amniotic fluid fibronectin concentrations with advancing gestational age. *Obstet Gynecol* 72: 593, 1988.
 - 25-Watanabe T, Araki M, Mimuro J, Tamada T, Sakata Y. Fibrinolytic components in fetal membranes and amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol*. 168(4):1283-9, 1993.
 - 26-Dahl LB, Kimpton WG, Cahil RNP, Brown TJ, Fraser JRE. The origin and fate of hyaluronan in amniotic fluid. *J Dev Physiol* 12:209-218, 1989.
 - 27-Dahl L, Hopwood JJ, Laurent UB et al. The concentration of hyaluronate in amniotic fluid. *Biochem. Med*. 30: 280, 1983.
 - 28-Longaker MT, Adzick S, Hall JL, et al. Studies in fetal wound healing. VII. Fetal wound healing may be modulated by hyaluronic acid stimulating activity in amniotic fluid. *J Pediatr Surg* 25:430-3, 1990.
 - 29-Longaker MT, Ernest SC, Micheal RH, et al. Studies in fetal wound healing. VII. Hyaluronic acid stimulating activity distinguishes fetal wound fluid from adult wound fluid. *Ann Surg* 210: 669-72, 1989.
 - 30-Agglar J, Engvall E, Werb Z. An irreversible tissue inhibitor of collagenase in human amniotic fluid: characterization and separation from fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun* 100: 1195-1201, 1981
 - 31-Murphy G, Cawston TE, Reynolds JJ. An inhibitor of collagenase from human amniotic fluid: purification, characterization and action on metalloproteinases. *Biochem J* 195: 167-170, 1981.
 - 32-Tatra G, Mattausch M, Reinhaller A. Determination of alpha 2-macroglobulin and alpha 1-antitrypsin in amniotic fluid using laser nephelometry *Z Geburtshilfe Perinatol*. 189(6):255-8, 1985.
 - 33-Spencer K, Coombes EJ, Wood PJ. The measurement of amniotic fluid alpha 2 macroglobulin by fixed time kinetic immunoturbidimetry. *J Clin Chem Clin Biochem* 21(3):133-7, 1983.
 - 34-Brock DJ. Amniotic fluid alpha2-macroglobulin and the antenatal diagnosis of spina bifida and anencephaly. *Clin Genet* 8(4):297-301, 1975.
 - 35-Ozgenel GY, Filiz G, Ozcan M. Effects of human amniotic fluid on cartilage regeneration from free perichondrial grafts in rabbits. *Br J Plast Surg*. 2004 Jul;57(5):423-8

- 36-Ozgenel GY, Filiz G. Effects of human amniotic fluid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *J Neurosurg.* 2003 Feb;98(2):371-7.
- 37-Ozgenel GY. The influence of human amniotic fluid on the potential of rabbit ear perichondrial flaps to form cartilage tissue. *Br J Plast Surg.* 2002 Apr;55(3):246-50.
- 38-Yılmaz Y. Amniotik sıvının kırık iyileşmesi üzerine etkisi. Uzmanlık tezi. Bursa, 2000.
- 39-Turan ŞH. Erişkin tavşanlarda kemik kırık iyileşmesini insane amniotik sıvısının etkisi. Uzmanlık tezi, Bursa, 2001.
- 40-Tirelioğlu O. Tavşanda deneysel osteoartrit modelinde insan amniotik sıvısının eklem içi uygulanmasının kırık dokusu ve sinovya üzerindeki etkisi Uzmanlık tezi, Bursa, 2005.
- 41-Yoshioka M, Coutts R, Amiel D, Hacker SA. Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Ost Cart.* 4: 87-98, 1996.
- 42-Pelletier JP, Fernandes JC, Brunet J, Moldovan F. Mitogen activated protein kinase 1/2 in rabbit experimental osteoarthritis is associated with a reduction in the development of structural changes. *Arthritis Rheum.* 2003 June;48, 1582-93
- 43-Mankin JH, 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;53:523-537.
- 44-Pendleton A, Arden N, Dougados M, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JW, et al. EULAR recommendations for the management of knee osteoarthritis: report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis* 2000;59:936-44
- 45-Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage II: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect.* 1998;47:487-504.
- 46-Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am.* 2007 Apr;89(4):780
- 47-Hunziker EB, Kapfinger E, Martin J, Buckwalter J, Morales TI. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) is closely associated with the chondrocyte nucleus in human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007 Aug
- 48-Roman-Blas JA, Stokes DG, Jimenez SA. Modulation of TGF-beta signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007 Dec;15(12):1367-77
- 49-Schmidt TA, Gastelum NS, Han EH, Nugent-Derfus GE, Schumacher BL, Sah RL. Differential regulation of proteoglycan 4 metabolism in cartilage by IL-1alpha, IGF-I, and TGF-beta1. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007 Jun 25
- 50-Davidson E, Kraan M, Berg M. TGF-b and osteoarthritis. *OsteoArthritis and Cartilage* (2007) 15, 597-604
- 51-Peyron JG, Balazs EA. Preliminary clinical assesment of Na- hyaluronate injection into human arthritic joints. *Pathol. Biol.* 22:131, 1974
- 52-Papaioannou N, Krallis N, Triantafillopoulos I, Khaldi L, Dontas I, Lyritis G. Optimal timing of research after anterior cruciate ligament resection in rabbits. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2004 Nov;43(6):22-7
- 53-Bilgen ÖF. Deneysel osteoartritte erken dönemde gelişen histopatolojik değişiklikler. Uzmanlık tezi, Bursa, 1989.

- 54-Evans EB, Eggers GWN, Buttlar JK, Blumel J. Experimental immobilization and remobilization of rat knee joints. *J Bone Joint Surg.* 42A: 737-58, 1960
- 55-Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits: Preliminary report. *Acta Orthop Scand* 41: 522-30, 1970.
- 56-Pond MJ, Nuki G. Experimentally –induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis.* 32: 387-8, 1973.
- 57-Myers S, Brandt KD, O'Connor B, et al. Synovitis and osteoarthritis changes in canine articular cartilage after cruciate ligament transection. Effect of surgical hemostasis. *Arthritis Rheum* 33: 1406-15, 1990
- 58-Vignon E, Bejui J, Mathei P. Histological cartilage changes in rabbit model osteoarthritis. *J. Rheum.* 14.1987
- 59-Sellers R, Peluso D, Morris E. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 79A: 1452-1463, 1997
- 60-Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, et al. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel *J Bone Joint Surg Br.* 1989 Jan;71(1):74-80.
- 61-Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg A, Caplan A. A semi-quantitative scala for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anad.*143: 335-340, 1992
- 62-Martin I, Obradovich B. Method for Quantitative Analysis of Glycosaminoglycan Distribution in Cultured Natural and Engineered Cartilage *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 27, pp. 656–662, 1999
- 63-Tadashi H, Pickarski M, Zhuo Y. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis *Bone* 38 (2006) 234–243
- 64-Kühn K, D'Lima D, Hashimoto S. Cell death in cartilage *OsteoArthritis and Cartilage* (2004) 12, 1–16
- 65-Kuroki K. The effects of TIMP-1 and -2 on canine chondrocytes cultured in three-dimensional agarose culture system *OsteoArthritis and Cartilage* (2003) 11, 625–635
- 66-Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006 Jan;14(1)
- 67-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 Apr;58(4):208-13
- 68-Hongbin W, Jingyuan D, Linyun C, Yuming D. Carboxymethylated chitin reduces MMP-1 expression in rabbit ACLT osteoarthritic cartilage. *Ann Rheum Dis.* 2004 Apr;63(4):369-72
- 69-Matsuo M, Nishida K, Yoshida A, Murakami T, Inoue H. Expression of caspase-3 and -9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med Okayama.* 2001 Dec;55(6):333-40
- 70-Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.
- 71-Dang AC, Warren AP, Kim HT. Beneficial effects of intra-articular caspase inhibition therapy following osteochondral injury. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006 Jun;14(6):526-32
- 72-G. Verbruggen Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases. *Rheumatology* 2006;45:129–138

- 73-Jauernig S, Reist M, Spreng D. The Effects of Doxycycline on Nitric Oxide and Stromelysin Production in Dogs With Cranial Cruciate Ligament Rupture *Veterinary Surgery* 30:132-139, 2001
- 74-Kobayashi T, Notoya K. Fursultiamine, a vitamin B1 derivative, enhances chondroprotective effects of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate in rabbit experimental osteoarthritis *Inflamm. res.* 54 (2005) 249–255
- 75-Cho J, Shannon S, Winsor E. Proteomic Analysis of Human Amniotic Fluid *Molecular and cell proteomics* 2007
- 76-Tsangaris G, Pollak D, Lubec G. The amniotic fluid cell proteome *Electrophoresis* 2004, 25, 1168–1173
- 77-Takahashi K, Goomer RS, Harwood F, Kubo T, Hirasawa Y, Amiel D. The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1beta(IL-1beta), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 1999 Mar;7(2):182-90.
- 78-Kang Y, Eger W, Koepp H, Williams JM, Kuettner KE, Homandberg GA. Hyaluronan suppresses fibronectin fragment-mediated damage to human cartilage explant cultures by enhancing proteoglycan synthesis. *J Orthop Res.* 1999 Nov;17(6):858-69
- 79-Sen C, Güneş T, Saygi B, Erdem M, Köseoğlu RD, Kiliç N. The chondroprotective effect of intra-articular hyaluronic acid at early stages of osteoarthritis: an experimental study in rabbits *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2004;38(5):348-52.
- 80-Shimizu C, Kubo T, Hirasawa Y, Coutts RD, Amiel D. Histomorphometric and biochemical effect of various hyaluronans on early osteoarthritis. *J Rheumatol.* 1998 Sep;25(9):1813-9.
- 81-Nixon AJ, Brower-Toland BD et al. Insulinlike Growth Factor-I gene therapy applications for cartilage repair. *Clin Orthop.* 379S: 201-213, 2000
- 82-Weaver E, Sharif M. Microscopic Change in Macroscopically Normal Equine Cartilage from Osteoarthritic Joints *Connective Tissue Research,* 47:92–101, 2006
- 83-Aizawa T, Kon T, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Orthop Res.* 2001 Sep;19(5):785-96.
- 84-Schmidt B. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair *OsteoArthritis and Cartilage* (2006) 14, 403-412
- 85-Van Beuningen, Glansbeek H, Van Der Kraan. Osteoarthritis-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular transforming growth factor- β injections *Osteoarthritis and Cartilage* (2000) 8, 25–33
- 86-Kawasaki K, Ochi M, Uchio Y. Hyaluronic Acid Enhances Proliferation and Chondroitin Sulfate Synthesis in Cultured Chondrocytes Embedded in Collagen Gels *Journal Of Cellular Physiology* 179:142–148 (1999)
- 87-Aigner T, Kim H.A. Apoptosis and Cellular Vitality *arthritis & rheumatism* Vol. 46, No. 8, August 2002, pp 1986–1996
- 88-Aigner T, Kurz B, Fukui N. Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis *Curr Opin Rheumatol.* 2002 Sep;14(5):578-84.
- 89-Shikhman A, Amiel D, D'lima D. Chondroprotective activity of N-acetylglucosamine in rabbits with experimental osteoarthritis *Ann Rheum Dis* 2005;64;89-94
- 90-Blom AB, van Lent PL, Libregts S, Holthuysen AE, van der Kraan PM, van Rooijen N, van den Berg WB. Crucial role of macrophages in matrix

- metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis Rheum.* 2007 Jan;56(1):147-57.
- 91-Kamekura S, Hoshi K. Osteoarthritis development in novel experimental Mouse models induced by knee joint instability *OsteoArthritis and Cartilage* (2005) 13, 632-641
- 92-Moreland L W, Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action *Arthritis Res Ther* 2003 5:54-67
- 93-Satoğlu İ, Çoban İ, Gürel D. Tavşanlarda kondral defektlerin tedavisinde İAS ile insan amniotik membranının ayrı ayrı ve birlikte kullanımının etkileri. VIII. Türkiye Spor Yaralanmaları Artroskopisi ve Diz Cerrahisi Kongresi 2006.
- 94-Setton LA, Elliott DM, Mow VC. Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. *Osteoarthritis Cartilage.* 1999 Jan;7(1):2-14
- 95-Chang DG, Iverson EP, Schinagl RM, Sonoda M, Amiel D, Coutts RD, Sah RL. Quantitation and localization of cartilage degeneration following the induction of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage.* 1997 Sep;5(5):357-7
- 96-Vitanzo PC Jr, Sennett BJ. Hyaluronans: is clinical effectiveness dependent on molecular weight? *Am J Orthop.* 2006 Sep;35(9):421-8.
- 97-Marvin Y, Kim T. Chondrocyte apoptosis induced by collagen degradation: inhibition by caspase inhibitors and IGF- 1 *Journal of Orthopaedic Research* 22 (2004) 140--144

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde emeği olan baŐta Ortopedi ve Travmatoloji AD BaŐkanı Prof. Dr. Gayur Kurap ve tez hocam Prof. Dr. Ömer Faruk Bilgen olmak üzere Prof. Dr. Tufan Kaleli, Prof. Dr. Ufuk Aydınli, Prof. Dr. Kemal Durak, Prof. Dr. Bartu Sarisözen, Doç. Dr. Burak Demirağ, Uzm. Dr. Sadık Bilgen, Uzm. Dr. Teoman Atıcı'ya, tezimi hazırlamamda yardımcı bulunan Patoloji Anabilim Dalı'ndan Uzm. Dr. Ulviye Yalçinkaya ve Deney Hayvanları Merkezi'nden Vet. Hekim Faruk Küçükyıldız'a, birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma ve tüm anabilim dalı çalışanlarına, hayatım boyunca bana destek olan annem, babam ve kardeşime, asistanlığım boyunca fedakarlığını ve sevgisini hiç esirgemeyen eşime ve kızlarıma teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

9 şubat 1974 tarihinde Kayseride'de doğdum. İlkokulu Emine Akçakaya İlkokulu'nda, orta okulu Urfa Merkez Orta Okulu'nda ve lise eğitimimi ise Konya Gazi Lisesi' nde tamamladım. 1990 yılında İstanbul Tıp Fakültesi' nde tıp eğitimime başladım. 1996 yılında tıp fakültesinden mezun oldum. 1997-1998 yıllarında Kahramanmaraş ili Türkoğlu ilçesi Uzunsöğüt Sağlık Ocağı' nda pratisyen hekim olarak çalıştım. 1999-2002 yılları arasında SSK İstanbul Eğitim Hastanesi Anestezi ve Reanimasyon bölümünde asistanlık yaptım. 2002 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda göreve başladım. 2007 yılında uzmanlık eğitimimi tamamladım. Evli ve iki kız çocuk babasıyım.